



Analyse transcriptomique des cellules vasculaires isolées du tissu anévrysmal de l'aorte abdominale sous-rénale chez l'homme

Rafaëlle Spear

► To cite this version:

Rafaëlle Spear. Analyse transcriptomique des cellules vasculaires isolées du tissu anévrysmal de l'aorte abdominale sous-rénale chez l'homme. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S050 . tel-01174169

HAL Id: tel-01174169

<https://theses.hal.science/tel-01174169>

Submitted on 8 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ LILLE 2
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTÉ DE LILLE

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ
en Sciences de la Vie et de la Santé

**ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES CELLULES VASCULAIRES
ISOLÉES DU TISSU ANÉVRYSMAL DE L'AORTE ABDOMINALE SOUS-
RÉNALE CHEZ L'HOMME**

Soutenue publiquement le 10 décembre 2014 par
Rafaëlle SPEAR

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel	Président du Jury
Monsieur le Docteur Jean-Baptiste Michel	Rapporteur
Monsieur le Docteur Mathias Mericskay	Rapporteur
Monsieur le Professeur Stéphan Haulon	Examineur
Monsieur le Professeur Eric Allaire	Examineur
Madame le Docteur Florence Pinet	Directrice de thèse

Remerciements

Monsieur le Professeur Amouyel, vous me faites l'honneur d'être mon président de jury et je vous en remercie. Je vous suis reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre laboratoire.

Monsieur le Docteur Michel, vous me faites l'honneur de juger mon travail et je vous en remercie.

Monsieur le Docteur Mericskay, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Monsieur le Professeur Allaire, je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury pour juger mon travail de thèse d'Université.

Monsieur le Professeur Haulon, vous me faites l'honneur de juger mon travail. Je vous remercie d'avoir soutenu la réalisation de mon travail de thèse.

Madame le Docteur Pinet, je vous remercie de m'avoir initiée à la recherche et pour votre encadrement.

Remerciements

A toute l'équipe, présente et passée, pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur:
Olivia, Maggy, Marion, Annie, Gilles, Marine, Ludovic, Marie, Aude, Adelina, Pr
Lamblin, Pr Bauters.

A toute l'unité 744,

A tous ceux qui ont collaboré à la réalisation de ces travaux :

Pr. Lemoine, Dr Hot, Renaud Blervaque de l'Inserm U1019

Pr B. Staels et Jonathan Vanhoutte, INSERM U1011

Meryem Tardivel de l'IFR 114

Pr Haulon, Dr Azzaoui, Dr Sobocinski, Dr Maurel, Dr Koussa, Hôpital
Cardiologique, Chirurgie vasculaire, CHRU Lille

Pr Pruvot et son équipe, Chirurgie Générale et Transplantation, Hôpital Huriez,
CHRU Lille

Toute l'équipe de coordination en charge des prélèvements multiorganes, CHRU Lille

A mes collègues de chirurgie vasculaire qui ont soutenu la réalisation de ce travail,

A ma famille,

A Grégory,

A ceux qui nous ont quitté,

Publications :

Boytaard L, **Spear R**, Chinetti-Gbaguidi G, Acosta-Martin AE, Vanhoutte J, Lamblin N, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. Role of proinflammatory CD68(+) mannose receptor(-) macrophages in peroxiredoxin-1 expression and in abdominal aortic aneurysms in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013. 33:431-8.

Spear R, Boytaard L, Blervaque R, Chwastyniak M, Hot D, Vanhoutte J, Staels B, Lemoine Y, Lamblin N, Pruvot FR, Haulon S, Amouyel P, Pinet F. MicroRNA profiling of cells isolated from human abdominal aortic aneurysms. Let-7f, a new potential circulating biomarker. Article soumis dans *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*

Spear R, Boytaard L, Blervaque R, Chwastyniak M, Vanhoutte J, Hot D, Staels B, Lemoine Y, Lamblin N, Pruvot FR, Haulon S, Amouyel P, Pinet F. Adventitial tertiary lymphoid organs in AAA are a potential source of miRNAs as biomarkers. Article soumis dans *Int J Mol Sci.*

Communications orales:

Spear R, Boytaard L, Acosta-Martin AE, Vanhoutte J, Pruvot FR, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. *Printemps de la Cardiologie, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Marseille, Avril 2013.* Caractérisation des cellules musculaires lisses anévrysmales par ADAMTS 5, un nouveau biomarqueur chronologique potentiel de l'Anévrysme de l'aorte abdominale sous-renale.

Spear R, Senez M, Boytaard L, Bésème O, Vanhoutte J, Pruvot FR, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. *Journée André Verbert, Ecole Doctorale de Biologie Santé de Lille, Septembre 2013.* Aneurysmal smooth muscle cells characterization with ADAMTS 5, a new potential biomarker of infrarenal abdominal aortic aneurysm.

Spear R, Boytaard L, Blervaque R, Vanhoutte J, Chwastyniak M, Pruvot FR, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. *International Meeting on Aortic Disease, Liège, Septembre 2014.* Screening of microRNAs expressed in isolated cells of human abdominal aortic aneurysm for the identification of potential biomarkers.

Communications affichées:

Spear R, Boytaard L, Acosta-Martin AE, Vanhoutte J, Pruvot FR, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. *Printemps de la Cardiologie, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Bordeaux, Avril 2012.* ADAMTS 5, un marqueur potentiel des cellules musculaires lisses allongées présentes dans la paroi de l'anévrysme de l'aorte abdominale chez l'Homme

Spear R, Boytaard L, Acosta-Martin AE, Vanhoutte J, Pruvot FR, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. *Printemps de la Cardiologie, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire,*

Publications et Communications

Marseille, Avril 2013. Caractérisation des Cellules musculaires lisses anévrysmales par ADAMTS 5, un nouveau biomarqueur chronologique potentiel de l'anévrysme de l'aorte abdominale chez l'Homme

Spear R, Sennez M, Boytard L, Bèsème O, Vanhoutte J, Pruvot FR, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. *Printemps de la Cardiologie, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, Strasbourg, Avril 2014.* Caractérisation des Cellules musculaires lisses anévrysmales par ADAMTS 5, un nouveau biomarqueur chronologique potentiel de l'anévrysme de l'aorte abdominale chez l'Homme.

Spear R, Boytard L, Blervaque R, Vanhoutte J, Chwastyniak M, Pruvot FR, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. *Vascular Research Initiatives Conference, Toronto, Avril 2014.* Screening of microRNAs expressed in isolated cells of human abdominal aortic aneurysm for the identification of potential biomarkers.

Spear R, Boytard L, Blervaque R, Vanhoutte J, Chwastyniak M, Pruvot FR, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Scientific Session, Toronto, Mai 2014.* Screening of microRNAs expressed in isolated cells of human abdominal aortic aneurysm for the identification of potential biomarkers"

ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES CELLULES VASCULAIRES ISOLÉES DU TISSU ANÉVRYSMAL DE L'AORTE ABDOMINALE SOUS-RÉNALE CHEZ L'HOMME

L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est un problème de Santé Publique qui touche principalement les hommes de plus de 65 ans. L'AAA souvent asymptomatique évolue vers la rupture associée à un taux de mortalité élevé. Parmi les acides ribonucléiques (ARNs) non codants, les microARNs (miARNs), stables dans le tissu et les biofluides, sont des candidats intéressants dans la recherche de biomarqueurs.

L'inflammation, la dégradation de la matrice extra-cellulaire (MEC) et la raréfaction de la média participent à l'AAA. De nombreuses cellules inflammatoires sont impliquées dans l'AAA. La raréfaction des cellules musculaires lisses (CML) est secondaire à l'anoïkis, apoptose par détachement cellulaire de la MEC. Une analyse protéomique différentielle de CML en culture, issues de patients porteurs d'AAA, réalisée au laboratoire a montré que la désintégrine et metalloprotéase avec un motif de thrombospondine 5 (ADAMTS 5) est surexprimée dans les CML de patients présentant un AAA. L'isolement des cellules par la microdissection laser permet de conserver le phénotype des cellules isolées et de mettre en évidence des marqueurs potentiels de l'AAA masqués par l'analyse du tissu global.

Mon travail de thèse a consisté à partir des cellules isolées de la paroi anévrysmale de l'aorte abdominale sous-rénale chez l'Homme: à effectuer une analyse globale des miARNs et une analyse ciblée de l'ADAMTS 5, métalloprotéase qui a une action enzymatique sur les protéines de la MEC. Les objectifs de ce travail sont une meilleure compréhension de l'AAA et l'identification de nouveaux biomarqueurs.

La distribution des cellules dans la paroi anévrysmale est étudiée par immunohistochimie sur des biopsies anévrysmales et d'aortes saine obtenues chez l'Homme. Les cellules localisées sont isolées par microdissection laser. L'analyse par criblage de l'expression des miARNs des cellules isolées de l'AAA et des CML issues d'aorte saine est réalisée sur puce. L'expression différentielle de miARNs sélectionnés est analysée par PCR quantitative dans des cellules isolées de l'AAA et dans du tissu global. L'expression des miARNs sélectionnés est ensuite comparée dans le plasma des patients présentant un AAA et de patients athérosclérotiques sans AAA par PCR pour identifier de potentiels biomarqueurs.

Dans l'AAA, les macrophages M1 proinflammatoires sont retrouvés dans l'adventice et les macrophages M2 anti inflammatoires dans le thrombus intraluminal, les lymphocytes de type B sont retrouvés organisés en organe lymphoïde tertiaire adventitielle ou ATLOs dans 11 échantillons sur 20 analysés. Les CML sont rares et strictement localisés au niveau de la média. Sur 850 miARNs testés dans la puce, 205 miARNs sont exprimés dans les cellules isolées. Les miR-29b et let-7f sont augmentés dans le plasma de patients porteurs d'AAA et représentent de potentiels biomarqueurs.

L'expression d'ADAMTS 5 dans les CML de la paroi anévrysmale est évaluée par immunohistochimie dans la paroi aortique saine et anévrysmale et quantifiée par Western-blot dans les CML isolées de la paroi aortique saine et anévrysmale.

Deux morphotypes de CML anévrysmales ont été identifiés: un morphotype arrondi positif au marqueur de l'apoptose, caspase 3 et un morphotype allongé, similaire aux CML de l'aorte saine. Le profil d'expression des sous-unités d'ADAMTS 5 est différent dans les CML arrondies et les CML allongées anévrysmales et saines. La mise en apoptose des CML a été mise au point in vitro pour étudier les mécanismes impliqués dans les modifications d'expression d'ADAMTS 5 dans l'AAA et les conséquences sur son action enzymatique.

L'approche systématique de l'expression transcriptomique des cellules anévrysmales isolées a identifié des marqueurs potentiels de l'AAA, les miR-29b et let-7f et l'analyse ciblée suggère l'implication d'ADAMTS 5 dans le profil évolutif des CML vers l'anoïkis dans l'AAA. Des études complémentaires permettront une meilleure compréhension de l'AAA.

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF ISOLATED VASCULAR CELLS IMPLICATED IN ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM IN HUMAN
--

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a public health problem, which mainly affects men older than 65 year. AAA are usually asymptomatic with a natural evolution towards rupture associated with a high mortality rate. Among non coding ribonucleic acids (RNAs), microRNAs are stable in tissue and biofluids and are interesting candidates for the search of biomarkers.

Inflammation, extracellular matrix (ECM) degradation and media rarefaction are involved in AAA. Many inflammatory cells are involved in AAA. Anoikis is an apoptosis secondary to a cell detachment from ECM and is responsible for rarefaction of smooth muscle cells (SMC). Differential proteomic analysis of cultured SMC from AAA patients was performed in the laboratory and highlighted the overexpression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif of type 5 (ADAMTS 5) in SMC of AAA patients. Isolation of cells with laser microdissection allows to keep their phenotype and to find potential markers that may be masked by global tissue analysis.

The aim of my PhD work was to perform a global miRNA screening of cells isolated from human aneurysmal wall and an analysis targeted on ADAMTS 5, a metalloprotease with an enzymatic activity on ECM proteins. The main objectives were a better understanding of AAA and the identification of new biomarkers.

The distribution of cells in the aneurysmal wall was studied by immunohistochemistry in human aneurysmal and healthy aortic samples. Once located, the cells were isolated by laser microdissection and screened for miRNAs by microarrays. Differential expression of selected miRNAs was quantified by PCR in the cells isolated by laser microdissection and in whole aortas. They were then compared in plasma of AAA patients and atherosclerotic patients without AAA by quantitative PCR to identify potential biomarkers.

In AAA, the M1 proinflammatory macrophages were located in the adventitia and the M2 antiinflammatory macrophages in the intraluminal thrombus; the type B lymphocytes were organized in tertiary lymphoid organs (ATLOs) in 11/20 of analysed samples. SMC were rare and restricted to the media. Among the 850 miRNAs tested on microarray, 205 miRNAs were detected in isolated cells. MiR-29b and let-7f were upregulated in plasma of AAA patients, and thus are potential biomarkers.

The expression of ADAMTS 5 in aneurysmal SMC was evaluated by immunohistochemistry of healthy and aneurysmal aortic wall and quantified by Western blot in isolated SMC from healthy and aneurysmal wall.

Two aneurysmal SMC morphotypes were identified: a rounded morphotype positive for caspase 3, an apoptotic marker, and a spindle-shaped morphotype similar to the healthy aortic SMC. The expression profile of ADAMTS 5 subunits was different in rounded SMC compared to aneurysmal and healthy spindle-shaped SMC. In vitro induction of apoptosis of SMC was established in order to study the mechanisms involved in ADAMTS 5 expression in AAA and their consequences on enzymatic actions.

The global transcriptomic screening of aneurysmal cells isolated by laser microdissection has identified potential markers of AAA, miR-29b and let-7f. The targeted analysis suggested that ADAMTS 5 is involved in the evolution profile of SMC towards anoikis in AAA. Further investigations will allow a better understanding of AAA pathophysiology.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
Liste des Abréviations	1
I INTRODUCTION	7
I.1 Contexte	7
I.1.1 Définition clinique	7
I.1.2 Histoire naturelle de l'AAA	7
I.1.3 Épidémiologie	8
I.1.4 Prise en charge de l'AAA	9
I.1.4.1 Traitement médical	9
I.1.4.2 Traitement chirurgical	10
I.1.5 Étiologies et facteurs de risque	11
I.1.5.1 Âge, sexe et ethnicité	11
I.1.5.2 L'athérosclérose	11
I.1.5.3 Le tabac	11
I.1.5.4 L'hypertension artérielle	12
I.1.5.5 Le diabète	13
I.1.5.6 La dyslipidémie	13
I.1.5.7 L'obésité	14
I.1.5.8 Les pathologies inflammatoires et infectieuses	14
I.1.6 Dépistage	15
I.2 Mécanismes physiopathologiques	16
I.2.1 Modification de la media dans l'AAA	16
I.2.2 L'inflammation dans l'AAA	17
I.2.2.1 Les neutrophiles	17
I.2.2.2 Les lymphocytes	18
I.2.2.3 Les mastocytes	19
I.2.2.4 Les macrophages	19
I.2.3 Le thrombus intraluminal	20
I.2.4 Phénomènes de convection	21
I.3 Biomarqueurs	21
I.3.1 Définition	22
I.3.2 Les biomarqueurs actuels de l'AAA	22
I.3.3 Recherche de biomarqueurs	26
I.3.4 Les cibles candidates	29
I.3.4.1 Les gènes	29
I.3.4.2 Les protéines	30
I.3.4.3 Les ARNs non codants	32
I.4 Choix des modèles et échantillons analysés	35
I.4.1 Modèles animaux	35
I.4.2 Échantillons d'origine humaine	37
I.4.2.1 Les biopsies anévrysmales	37
I.4.2.2 Le plasma des patients présentant un AAA	38
I.4.2.3 Le choix des contrôles	39
I.4.3 Intérêt d'étudier les cellules isolées de biopsies AAA	40
I.5 Méthodes d'analyse des miARNs	41
I.5.1 Rétrotranscription PCR (RT-PCR)	42
I.5.2 Les puces à miARNs	43

I.5.3 Séquençage d'ARN.....	44
II OBJECTIFS.....	47
II.1 Stratégie expérimentale.....	47
II.1.1 Protéines candidates issues du criblage protéomique	47
II.1.1.1 ADAMTS 5 et les CML	47
II.1.1.2 Peroxiredoxine 1 et les deux sous-types de macrophages.....	48
II.1.2 Validation de l'approche par microdissection laser	49
II.1.3 Criblage des miARNs dans les cellules isolées impliquées dans l'AAA.....	49
II.2 Recherche de biomarqueurs plasmatiques de l'AAA.....	50
III TRAVAUX PRÉLIMINAIRES	53
III.1 Échantillons.....	53
III.1.1 Banque de biopsies AAA et non AAA	53
III.1.2 Banque de plasmas LILAS.....	54
III.2 Distribution des cellules impliquées dans l'AAA.....	55
III.3 Cellules isolées par microdissection laser.....	59
IV RÉSULTATS	54
A. Approche ciblée : les biomarqueurs potentiels de l'AAA.....	63
IV.1 ADAMTS 5 et les CML anévrysmales	63
IV.1.1 Contexte.....	63
IV.1.2 Les deux morphotypes de CML dans l'AAA	64
IV.1.2.1 Immunohistochimie	64
IV.1.2.2 Caractérisation des morphotypes observés de CML	67
IV.2 Profil d'expression d'ADAMTS 5 dans les CML.....	69
IV.3 Profil d'expression d'ADAMTS 5 dans le plasma	74
IV.4 Discussion	77
IV.5 PRDX-1 et les deux sous-types de macrophages.....	81
Article: Rôle des macrophages pro-inflammatoires CD68+MR- dans l'expression de peroxiredoxine-1 dans les anévrysmes de l'aorte abdominale chez l'homme - <i>Role of proinflammatory CD68(+) mannose receptor(-) macrophages in peroxiredoxin-1 expression and in abdominal aortic aneurysms in humans.</i> Boytaard L, Spear R, Chinetti-Gbaguidi G, Acosta-Martin AE, Vanhoutte J, Lamblin N, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol.</i> 2013; 33 , 431-438.	
B. Approche sans a priori : vers une meilleure compréhension de l'AAA.....	85
IV.6 Criblage des miARNs à partir des cellules isolées du tissu anvrismal humain. 87	
Article: Criblage des microARNs des cellules isolées de l'anévrysme de l'aorte abdominal chez l'Homme. Let-7f, un nouveau biomarqueur circulant potentiel - <i>MicroRNA profiling of cells isolated from human abdominal aortic aneurysms. Let-7f, a new potential circulating biomarker.</i> Spear R, Boytaard L, Blervaque R, Chwastyniak M, Hot D, Vanhoutte J, Staels B, Lemoine Y, Lamblin N, Pruvot FR, Haulon S, Amouyel P, Pinet F	
IV.7 Les microARNs des ATLOs.....	91
Article: Les organes adventitiels lymphoïdes tertiaires dans l'anévrysme de l'aorte abdominale sont une source potentielle de microARNs biomarqueurs - <i>Adventitial tertiary lymphoid organs in AAA are a potential source of miRNAs as biomarkers</i> Spear R, Boytaard L, Blervaque R, Chwastyniak M, Vanhoutte J, Hot D, Staels B, Lemoine Y, Lamblin N, Pruvot FR, Haulon S, Amouyel P, Pinet F	
IV.8 Conclusion	95

V	CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	97
A.	Approche ciblée : les biomarqueurs potentiels de l'AAA.....	98
B.	Approche sans <i>a priori</i> : vers une meilleure compréhension de l'AAA.....	101
VI	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	105

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des Abréviations

α -SMA: alpha *smooth muscle actin*

AAA: Anévrisme de l'aorte abdominale

ADN: Acide désoxyribonucléique

AGEs: *Advanced glycation end products*

Angio-TDM: angio-tomodensitométrie

ARM: Angio imagerie par résonnance magnétique

ARN: Acide Ribonucléique

ATLO: *Adventitial tertiary lymphoid organs*

CD: *Cluster of differentiation*

CML: Cellules musculaires lisses

DIGE : *differential gel electrophoresis*

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GWAS: *Genome-wide association study*

HAS: Haute Autorité de Santé

HO-1: Hème oxygénase 1

HTA: Hypertension artérielle

ICAM 1: *Intercellular adhesion molecule 1*

kDa: kilodalton

LDL: Lipoprotéine de faible densité

LDLR: Récepteur de lipoprotéine de faible densité

LMD : *Laser microdissection*

LNA: *Locked Nucleic Acid*

lnc ARN: ARN long non codant

MALDI-TOF: ionisation/désorption laser assistée par matrice et analyse par temps de vol

MEC: Matrice extracellulaire

MeSH: *Medical Subject Headings*

miARN: MicroARN

MMP: Métalloprotéinases matricielles

NGAL: *Neutrophil gelatinase associated lipocalin*

NFκB: *Nuclear factor kappa B*

NIH: *National Institute of Health*

ORO : Oil Red O

PCR: Réaction de polymérase en chaîne

PRDX-1: Peroxiredoxine 1

PPIA: cyclophiline A

qRT-PCR: *Quantitative Rétrotranscription PCR*

RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay*

RIN: *RNA integrity number*

ROS: *Reactive Oxygen Species*

RT-PCR: *Retrotranscription PCR*

SDS: Sodium dodécyl sulfate

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

TIL: Thrombus intra-luminal

TIMPs: Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases

TNF α: *Tumor Necrosis Factor α*

t-PA: Activateur tissulaire du plasminogène

INTRODUCTION

I INTRODUCTION

I.1 Contexte

I.1.1 Définition clinique

L'aorte, artère principale de l'organisme, peut être le siège d'une dilatation anévrysmale le plus fréquemment au niveau de l'aorte abdominale sous-rénale. L'anévrysme de l'aorte abdominale (AAA) est défini par une perte du parallélisme de la paroi aortique abdominale avec un diamètre supérieur à 1,5 fois le diamètre de l'aorte saine (Figure 1). Le diamètre aortique sain est de 2,5 à 3 cm avec une variabilité inter-individuelle importante. La dilatation anévrysmale aboutit à la rupture de la paroi aortique pathologique qui constitue une urgence chirurgicale pour traiter l'hémorragie interne massive.

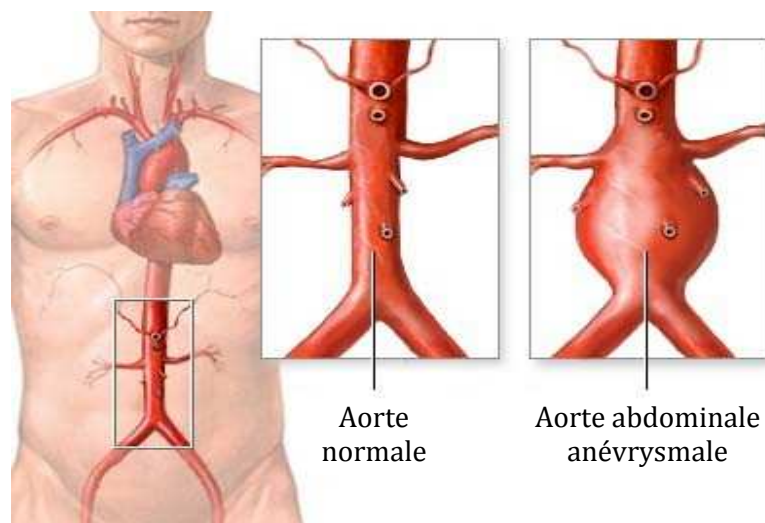


Figure 1 - Représentation schématique d'une aorte abdominale normale et d'une aorte abdominale anévrysmale

I.1.2 Histoire naturelle de l'AAA

La dilatation anévrysmale est d'évolution asymptomatique. Toutefois, des symptômes peuvent être évocateurs de la pathologie avant sa rupture. Ces symptômes varient de la compression extrinsèque d'organe (uretère, organes creux digestifs) à des lombalgies par érosion des corps vertébraux par la paroi anévrysmale, à l'ischémie aiguë de membre ou à un

syndrome des embolies de cholestérol via des embolies migrant du thrombus anévrysmal situé dans la lumière aortique anévrysmale. Un AAA symptomatique est cependant souvent évocateur de la rupture de l'anévrysme (Figure 2) et de situations urgentes telles que les fistules aorto-digestive ou aorto-cave.

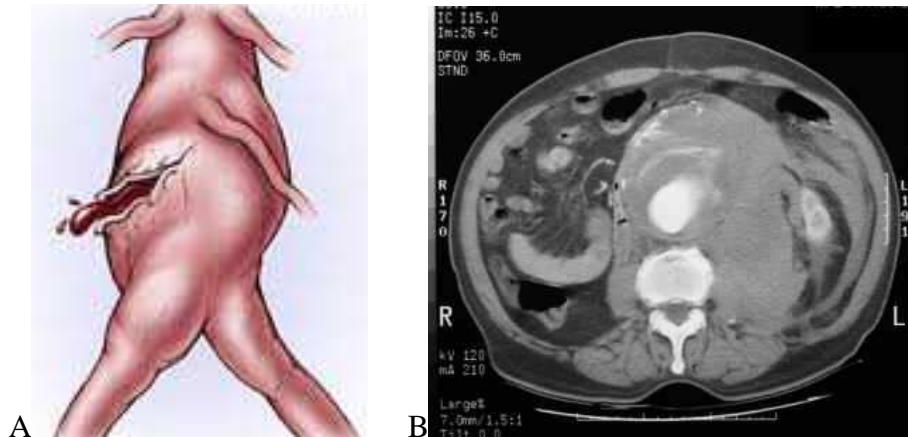


Figure 2 - A: Représentation schématique de la rupture d'un anévrysme de l'aorte abdominale. B: Coupe axiale d'une angiotomodensitométrie permettant la confirmation diagnostique d'une rupture d'AAA.

Ce symptôme est un syndrome douloureux abdominal aigu éventuellement associé à un état de choc hémorragique. Tout anévrysme abdominal douloureux non rompu représente un syndrome fissuraire précédant la rupture aortique et nécessite une prise en charge en urgence. L'AAA est donc une pathologie chronique d'évolution asymptomatique et dont la symptomatologie, souvent évocatrice de rupture, est associée à un pronostic vital engagé.

1.1.3 Épidémiologie

L'AAA concerne 0,22% de la population générale selon la Haute Autorité de Santé (HAS, Novembre 2012) et 5% des hommes de plus de 65 ans en France (Collège des Enseignants de Médecine Vasculaire, 2013), 2,2% en Suède (Svensjö et al, 2011). La prévalence de l'AAA varie dans la littérature de 1% à 12,7% (Stather et al, 2014). Cette prévalence diminue grâce au contrôle des facteurs de risques cardio-vasculaires (Choke et al, 2012). Aux USA, les

anévrismes aortiques quelque soit leur localisation sont responsables de 10 597 décès en 2009.

Le taux de rupture est par ailleurs corrélé au diamètre de l'AAA de façon exponentielle avec au seuil de 5 cm, un risque de rupture qui est égal à la survenue de complication postopératoire (Brewster et al, 2003). Ainsi, pour les anévrismes de 5,5 cm de diamètre et au-delà, une indication de traitement chirurgical est retenue. Au-delà de 80 mm de diamètre, l'AAA présente un risque de rupture de 50% dans l'année à venir. Une expansion de plus de 5 mm en 6 mois est également associée à un taux de rupture plus élevé qu'un AAA de même taille évoluant moins rapidement (Brady et al, 2004).

1.1.4 Prise en charge de l'AAA

La prise en charge de l'AAA dépend de la taille de l'AAA. Le traitement médical et le contrôle des facteurs de risque modifiables s'appliquent à tous les anévrismes. Le traitement chirurgical est réservé aux AAA à risque de rupture supérieur au risque du traitement chirurgical.

1.1.4.1 Traitement médical

Le contrôle des facteurs de risque est nécessaire pour ralentir la progression de l'AAA. Le sevrage tabagique est indispensable. Le contrôle de l'hypertension artérielle est recommandé sans spécificité d'un antihypertenseur de choix dans l'AAA. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ont été évoqués pour ralentir la progression de l'AAA (Silverberg et al, 2014). Les statines ont un bénéfice sur la progression de l'AAA mais également sur la mortalité postopératoire des AAA rompus (Wemmelund et al, 2014). Les antiagrégants plaquettaires sont également indiqués dans le traitement de l'AAA en prévention secondaire, un ralentissement de la croissance sur les AAA de taille modérée a été montré avec de faibles doses d'aspirine (Lindholt et al, 2008).

I.1.4.2 Traitement chirurgical

Plusieurs situations sont à différencier concernant la chirurgie de l'AAA. En l'absence de symptomatologie, seuls les anévrysmes de plus de 50 mm de diamètre et/ou évoluant de plus de 5 mm en 6 mois relèvent d'un traitement chirurgical. Les options chirurgicales sont une exclusion de l'AAA par voie endovasculaire ou une mise-à-plat-greffe prothétique par laparotomie ou laparoscopie (Figure 3). Le choix du traitement chirurgical se fait après une analyse de l'histoire médicale et chirurgicale du patient associée à une analyse de l'imagerie préopératoire, en général angio-TDM ou ARM et des critères anatomiques.

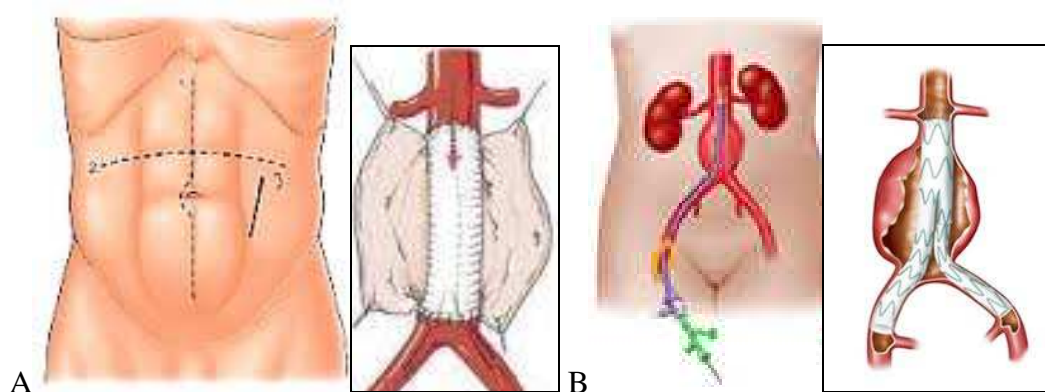


Figure 3 - A: Voies d'abord nécessaires et possibles pour le traitement par mise-à-plat-greffe prothétique de l'AAA et représentation schématique du traitement. B: Incision au niveau du scarpa droit et ponction percutanée controlatérale pour le traitement endovasculaire de l'AAA représenté sur le schéma de droite.

Lorsque l'AAA est symptomatique, la chirurgie devient urgente. Les options chirurgicales par laparotomie ou par voie endovasculaire peuvent être discutées selon les centres. La chirurgie en urgence est associée à une morbidité plus élevée que lors d'une chirurgie programmée. Les données hospitalières françaises révèlent 34% de décès secondaire à une chirurgie d'anévrysme rompu et 3% en cas d'anévrysme non rompu. La mortalité périopératoire des AAA rompus est de 38% (contre 3% en cas d'AAA non rompus) et 79% de retour à domicile (contre 36% en cas d'AAA non rompus). L'augmentation de la morbidité en situation d'urgence souligne l'importance d'un dépistage précoce de la pathologie anévrysmale dans la population à risque.

I.1.5 Étiologies et facteurs de risque

I.1.5.1 Âge, sexe et ethnicité

L'AAA est une pathologie qui touche de façon prédominante les hommes contrairement à ce qui avait initialement décrit (Silane et al, 1996). La proportion d'AAA dans la population générale est d' 1 femme pour 13 hommes en France (HAS, Novembre 2012). Pour une population de 3450 femmes et 122 272 hommes, les femmes présentent un risque de 1/4 d'avoir un AAA de plus de 3 cm par rapport aux hommes et de 1/10 pour les AAA de plus de 4 cm (Lederle et al, 2001). Cette différence s'étend au risque de rupture. Le risque de rupture d'un AAA entre 5 cm et 6 cm est 4 fois supérieur chez la femme (Brown et al, 2003).

Le risque de développer un AAA est plus important chez les hommes noirs comparés aux hommes blancs (Lederle et al, 2000) mais s'inverserait dans la population féminine (Lederle et al, 2001). De même les populations hispaniques et asiatiques ont un risque moins élevé que les caucasiens de développer un AAA (Kent et al, 2010).

I.1.5.2 L'athérosclérose

L'AAA est associée à l'athérosclérose (Powell et al, 1989). Les facteurs de risque de l'AAA sont donc ceux des pathologies cardiovasculaires à savoir l'âge, le sexe masculin, la consommation de tabac, l'hypertension artérielle (HTA), et l'association à d'autres pathologies cardiovasculaires (Kent, 2010). Malgré des facteurs de risque communs et une histologie similaire, l'athérosclérose occlusive et l'AAA sont deux pathologies distinctes (Shteinberg et al, 2000).

I.1.5.3 Le tabac

La consommation de tabac est un facteur de risque majeur de l'AAA. Les études épidémiologiques concluent à cette association (Lederle et al, 2000-Jamrozik et al, 2000-Svensjö et al, 2011). La consommation de tabac est également associée à une progression accélérée de 0,35 mm par an de l'AAA pour les AAA de petite taille selon une méta-analyse regroupant 15 475 sujets (Sweeting et al, 2012). Cette méta-analyse confirme les observations

de l'essai "United Kingdom Small Aneurysm Trial" sur le risque de rupture de l'AAA doublé chez les patients fumeurs en comparaison aux patients ayant cessé leur consommation de tabac (The UK Small Aneurysm Trial Participant, 1999). L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est augmenté dans le plasma de 70 patients présentant un petit AAA (Lindholt et al, 2003) et pourrait être lié à la consommation de tabac. *In vivo* dans le modèle d'AAA induit par perfusion d'élastase, l'exposition au tabac augmente l'infiltrat dans la paroi aortique anévrysmale de lymphocytes T et modifie la réponse des leucocytes en comparaison à la paroi anévrysmale des souris non exposées à la fumée de cigarette (Jin et al, 2012).

I.1.5.4 L'hypertension artérielle

L'HTA est communément associée avec l'AAA (Jamrozik et al, 2000 - Krohn et al, 1992- Kanagasabay et al, 1996 - Singh et al, 2001 - Vardulaki et al, 2000 - Simoni et al, 1995 - Törnwall et al, 2001 - Kent et al, 2010) mais cette association n'est pas toujours observée (Alcorn et al, 1996 - Blanchard et al, 2000 - Lee et al, 1997 - Collin et al, 1988 - Bengtsson et al, 1991 - Scott et al, 1991 - Smith et al, 1993 - Wanhainen et al, 2005).

Dans les modèles animaux, cette association est également controversée. La progression d'un AAA induit par perfusion d'élastase est influencée par la pression artérielle. Les AAA chez les animaux hypertendus sont plus larges que chez les animaux normotendus (Gadowski et al, 1993). Cette différence serait due à la production de NFkappaB (NFκB), dont l'inhibition augmenterait la production de MMP dans la paroi et l'infiltration des macrophages (Shiraya et al, 2006). Inversement, dans le modèle d'AAA par perfusion d'angiotensine II dans des souris hypercholestérolémiques, la progression de l'AAA est indépendante de l'hypertension artérielle.

I.1.5.5 Le diabète

Une corrélation négative a été observée entre un AAA et le diabète (Lederle et al, 2000) et confirmée par une récente méta-analyse de 13 études dont 6 prospectives, 5 cohortes et 2 cas/contrôle (Takagi et al, 2014).

Le diabète qui est un facteur de risque cardiovasculaire majeur, semble ralentir la progression des petits anévrysmes en inhibant la production de métalloprotéinases par les monocytes-macrophages (Golledge et al, 2008). L'hyperglycémie entraîne une réponse opposée à celle observée dans l'AAA en stimulant la prolifération des CML et la production du collagène structurant la matrice extracellulaire (Jones et al, 1999). Le diabète est associé à une résistance à la protéolyse via le dépôt d'*advanced glycation end products* (AGEs) (Norman et al, 2007).

I.1.5.6 La dyslipidémie

L'association du taux de cholestérol avec un AAA est encore mal définie. En effet, dans une étude rétrospective de 3 millions d'individus, l'hypercholestérolémie non définie dans l'étude est associée à une augmentation du risque d'AAA (Kent et al, 2010). Dans une étude plus récente, un taux de cholestérol total supérieur ou égal à 200 mg/dL est associé à un risque diminué d'AAA (Chun et al, 2014). Cependant, l'analyse d'une cohorte de 3327 hommes âgés de 65 à 83 ans a montré que la concentration sérique en HDL-cholestérol était plus faible chez les patients présentant un AAA (Golledge et al, 2010). D'autre part, un antécédent familial d'anévrysme quelque soit sa localisation est un facteur de risque d'AAA. L'analyse en GWAS, pour *Genome-wide association study*, a montré que le variant rs6511720 du récepteur du LDL-cholestérol (LDLR) était significativement associé à la présence d'un AAA (Bradley et al, 2013).

I.1.5.7 L'obésité

L'obésité est associée à la pathologie athérothrombotique. L'association avec l'AAA a été étudiée plus récemment. Une étude suédoise de 63 655 hommes et femmes âgés de 46 à 84 ans montrent une augmentation de l'incidence des AAA entre le tour de taille de 100 cm chez l'homme et 88 cm, sans relation mise en évidence avec le BMI (Stackelberg et al, 2013). Une revue de 8 études récentes confirme l'association de l'obésité avec la présence de l'AAA mais non comme facteur influençant la progression (Cronin et al, 2013). Une méta-analyse de 19 études confirme l'absence d'association entre le risque d'AAA et le BMI (Takagi et al, 2014). Dans les modèles animaux d'infusion d'angiotensine II chez des souris hypercholestérolémiques ayant un déficit induit en adiponectine, diminuée chez les patients obèses, la formation de l'AAA serait favorisée par une augmentation de l'infiltration de macrophages et l'activation des MMP2 et MMP9 dans la paroi aortique anévrysmale (Yoshida et al, 2014). L'association entre l'obésité et l'AAA nécessite d'être confirmée.

I.1.5.8 Les pathologies inflammatoires et infectieuses

Les AAA peuvent être également d'origine inflammatoire liés à des pathologies telles que la maladie de Horton (Cotlar et al, 2006) ou maladie de Takayashu (Kallappa et al, 2013). Les greffes bactériennes sur le tissu aortique peuvent être responsables du développement d'anévrysme souvent sacciforme. Les mycobactéries et bactéries de la sphère ORL sont souvent responsables. Toutefois, les AAA infectieux restent rares (Oderich et al, 2001).

Une autre imputabilité des bactéries dans la pathologie anévrysmale est discutée. Une bactérie d'origine dentaire le *Porphyromonas gingivalis*, de portage sain, a été retrouvée dans les parois d'AAA (Kurihara et al, 2004). L'infection au *Porphyromonas gingivalis* dans un modèle murin permet de reproduire un thrombus d'AAA riche en neutrophiles permettant d'émettre l'hypothèse du rôle de *Porphyromonas gingivalis* dans l'activation des neutrophiles dans l'AAA (Delbosc et al, 2011).

Outre le *Porphyromonas gingivalis*, la coinfection par *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydomphila pneumoniae* augmenterait l'inflammation adventitielle et la dégradation de collagène (Roggerio et al, 2013). *C. pneumoniae*, une bactérie responsable d'infections pulmonaires (Grayston et al, 1992) souvent liée au tabac (Hahn et al 1992) et impliquée dans l'athérosclérose (Kuo et al, 1993) est détectée dans l'AAA (Juvonen et al, 1997). D'autre part, la présence de lymphocytes T spécifiques de *C. pneumoniae* mise en évidence dans l'AAA (Halme et al, 1999) et sa capacité d'induire la production de MMP par les macrophages (Kol et al, 1998) pourraient suggérer son imputabilité dans la formation d'AAA.

I.1.6 Dépistage

L'AAA est donc un problème de Santé Publique important devant être traité. L'AAA est une pathologie le plus souvent asymptomatique. L'examen physique permet le diagnostic de 30% des AAA (Aggarwal et al, 2011). L'AAA nécessite un dépistage qui est recommandé en France, aux États-Unis et au Royaume-Uni. Le dépistage de la population à risque permettrait la réduction de la mortalité due aux AAA de 50% (Lindholt et al, 2008) et de la chirurgie en urgence de 56% (Lindholt et al, 2010). La population cible de dépistage est variable selon les pays. En France, selon les recommandations de 2012 de la HAS, le dépistage est indiqué pour les hommes âgés de 65 à 75 ans, anciens fumeurs ou fumeurs actifs, et pour les hommes et femmes de plus de 50 ans ayant des antécédents familiaux. Le dépistage de l'AAA se fait par un écho-doppler. En effet, l'échographie est un examen répondant aux critères des examens de dépistage contrairement à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou à l'angio-tomodensitométrie (angio-TDM) (Isselbacher, 2005 - Petersen et al, 1995). L'échographie est non invasive non irradiante avec une bonne sensibilité et spécificité pour le diagnostic des AAA et un faible coût (Laroy et al, 1989 - Michel et al, 2011). L'évaluation socio-économique du dépistage de l'AAA est en faveur d'un dépistage échographique unique chez les hommes de plus de 65 ans mais reste cependant coûteux (Svensjö et al, 2014).

I.2 Mécanismes physiopathologiques

L'aorte normale est une artère de gros calibre constituée de trois tuniques : l'endothélium, la media et l'adventice de la lumière vers l'extérieur du vaisseau. L'évolution vers l'AAA est le siège de modification de ces différentes tuniques (Figure 4).

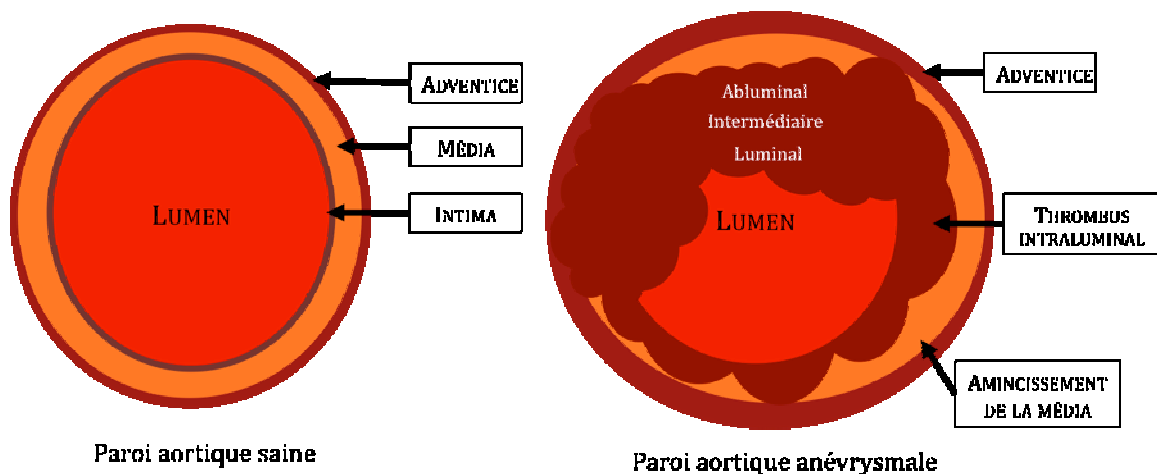


Figure 4 - Représentation schématique des couches composant la paroi aortique saine (à gauche) et anévrysmale (à droite).

I.2.1 Modification de la media dans l'AAA

La dilatation de la paroi aortique résulte de la perte de l'élasticité et de la résistance de celle-ci. De multiples facteurs peuvent expliquer cette fragilité pariétale (Davies et al, 1998). La media de l'aorte, qui contient les cellules musculaires lisses (CML) et la matrice extracellulaire (MEC), est le siège de modifications importantes dans l'AAA contribuant à la dilatation anévrysmale de la paroi aortique. Il existe une raréfaction des CML au cours de l'AAA (Lopez-Candales et al, 1997). Cette raréfaction est secondaire à l'apoptose des CML et ce mécanisme a été décrit comme étant l'anoïkis (Michel et al, 2003). L'anoïkis est l'apoptose secondaire au détachement des CML de la MEC.

La matrice extracellulaire est par ailleurs dégradée au cours de l'AAA par l'action de nombreuses enzymes dont les métalloprotéinases matricielles (MMP). Douze isoformes de MMP ont été décrites parmi lesquelles la MMP9, la MMP2 et la MMP3 ont été détectées dans la paroi anévrysmale de modèle murin d'AAA et modifiées par l'action d'inhibiteurs des MMPs, les inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs) (Allaire et al, 1998). Ces MMPs sont sécrétées par les CML et les cellules inflammatoires participant à l'AAA notamment les macrophages (Thompson et al, 1995). L'élastine, composant essentiel de la paroi aortique, serait dégradée dans l'AAA. Les produits de dégradation de l'élastine ont été évalués dans le sérum de patients porteurs d'un AAA (Lindholt et al, 1997). L'élastase est associée à la destruction de l'élastine aortique. Les complexes circulants d'élastase et d'alpha-1-antitrypsine (α 1-AT), inhibant l'action de l'élastase, sont positivement corrélés à la progression des AAA ce qui suggérerait l'implication nécessaire d'autres protéases dans les petits AAA (Lindholt et al, 2003). Cette destruction de la MEC participe à la rigidification et à la perte d'élasticité de l'aorte décrite dans l'AAA (Davies et al, 1998).

1.2.2 L'inflammation dans l'AAA

L'inflammation est un processus majeur de l'AAA avec la participation de nombreuses cellules inflammatoires et la production des protéines destructrices de la MEC telles que les MMPs (Reeps et al, 2009) et les cathepsines (Lohoefer et al. 2012).

1.2.2.1 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont retrouvés principalement dans le thrombus intraluminal (TIL) de l'AAA et dans l'adventice (Houard et al, 2009). Ils secrètent les MMP (Fontaine et al, 2002) et participent au recrutement des autres cellules inflammatoires (Houard et al, 2009). En effet, leur déplétion dans les modèles animaux d'AAA est responsable d'une absence d'évolution anévrysmale avec la diminution de l'expression des MMP 2 et MMP9 ainsi que l'absence de recrutement des autres cellules inflammatoires (Eliason et al, 2005). Le rôle des neutrophiles

dans le recrutement des cellules est mis en évidence par Chertov et al (1997). La seule perte de fonction de recrutement des neutrophiles est responsable de l'absence de formation d'AAA dans le modèle d'élastase (Pagano et al, 2007). Les neutrophiles participent à l'action de l'élastase au sein de la paroi anévrysmale comme transporteurs de cette enzyme (Cohen et al, 1993). Ils augmentent la concentration de MMP9 dans le TIL comparativement au reste de la paroi de l'AAA (Fontaine et al, 2002). Ils produisent en effet la lipocaline associée à la gélatinase de neutrophile (NGAL) qui en formant des complexes avec la MMP9, la protège de la dégradation. Or, ces complexes sont retrouvés dans le thrombus et la paroi de l'AAA (Folkesson et al, 2007).

I.2.2.2 Les lymphocytes

Les lymphocytes regroupent deux types de lymphocytes. Ces cellules participent au processus inflammatoire, à l'immunité cellulaire pour les lymphocytes de type T et à l'immunité humorale pour les lymphocytes de type B. Les lymphocytes T formés dans le thymus sont cytotoxiques, ayant la capacité de reconnaître et détruire les cellules cibles, ou auxiliaires, permettant l'activation des autres lymphocytes. Les lymphocytes de type B produits dans la moëlle osseuse sont des lymphocytes mémoire ou deviennent des plasmocytes pouvant détruire les cibles par voie humorale. Les lymphocytes de type B et T sont retrouvés dans l'AAA avec une prédominance de la participation des lymphocytes T (Reeps et al, 2009). Les lymphocytes de type T sont une source de cytokines responsables de la mise en apoptose des CML dans l'AAA (Hendersen et al, 1999). Les lymphocytes retrouvés dans la paroi anévrysmale présente un phénotype de cellules mémoires et similaires à celui retrouvés dans les centres germinatifs. Ainsi, leur capacité à former des organes lymphoïdes tertiaires est évoquée (Ocana et al, 2003). Dans le cadre du travail de thèse de Ludovic Boytard au laboratoire, la localisation des lymphocytes de type B à l'aide du marqueurs anti-CD20 a permis de mettre en évidence des formations adventitielles lymphoïdes tertiaires de la

paroi vasculaire (ATLO) observés précédemment dans la paroi anévrysmale pour 8 échantillons humains sur 31 analysés (Bobryshev et al, 2001). Au sein du laboratoire, cette organisation lymphoïde a été observée sur 7 échantillons parmi les 20 analysés.

Outre leur présence dans l'AAA, les lymphocytes T auxiliaires sont diminués dans la circulation des patients présentant un AAA (Caligiuri et al, 2006). Ils régulent l'activation des macrophages et des lymphocytes T cytotoxiques mais également la production et l'activité de la MMP9 par les macrophages et ainsi leur diminution dans la circulation favoriserait le développement des AAA (Caligiuri et al, 2006).

I.2.2.3 Les mastocytes

Les mastocytes sont également indispensables au développement de l'AAA puisque les modèles de souris déficientes en mastocytes ne développent pas d'AAA (Sun et al, 2007). Elles sécrètent la tryptase, qui est surexprimée dans l'AAA et qui provoque l'apoptose des CML et dirige la migration des autres cellules inflammatoires (Zhang et al, 2011) et la cathepsine G qui activent les MMPs responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (Swedenborg et al, 2011). Les mastocytes jouent un rôle d'amplification de la réponse inflammatoire en recrutant d'autres cellules inflammatoires via la sécrétion de cytokines (Krishnaswamy et al, 2006).

I.2.2.4 Les macrophages

Les macrophages, cellules dérivées des monocytes, participent à l'inflammation dans la pathologie anévrysmale (Koch et al, 1990 - Bobryshev et al, 2001). Les propriétés de phagocytose de ces cellules inflammatoires interviennent précocement dans l'AAA (Michel et al, 2007). Leur capacité sécrétoire est également importante puisque de nombreuses molécules issues des macrophages ont été retrouvées augmentées dans l'AAA telles que le *Tumor Necrosis Factor* α (TNF α), le facteur d'inhibition de migration, la protéine 2 *angiopoietin-like* dérivée des macrophages (Kaneko et al, 2011 - Pan et al, 2003 - Tazume et

al, 2012). La collagénase et l'élastase qui participent à la destruction de la matrice extracellulaire dans l'AAA sont également sécrétées par les macrophages (Rizzo et al, 1989). Deux types de macrophages aux activités inflammatoires opposées sont identifiés, les macrophages de type M1 aux propriétés pro-inflammatoires et les macrophages de type M2 aux propriétés anti-inflammatoires (Gordon et al, 2003). La participation des deux types de macrophages a été étudiée dans les plaques athérosclérotiques (Chinetti-Gbaguidi et al, 2013) et dans l'AAA (Boytard et al, 2013).

1.2.3 Le thrombus intraluminal

Le TIL participe activement au processus pathologique de l'AAA. De nombreuses études concluent à la relation entre la présence d'un thrombus au sein de l'AAA et le risque de rupture ou d'expansion anévrysmale (Wolf et al, 1994 - Satta et al, 1996 - Stenbaek et al, 2000). En effet, le thrombus de l'AAA est actif au cours du processus anévrysmal avec une description en trois couches de la lumière vers la paroi (Figure 4). La couche luminale est rouge par la présence d'érythrocytes, la couche médiale jaune du fait de la lyse des érythrocytes et enfin la couche abluminale contre la paroi qui est généralement marron (Wilson et al, 2013). Le TIL contient de nombreuses cellules inflammatoires impliquées dans l'AAA telles que les macrophages (Kazi et al, 2005) et les neutrophiles avec des concentrations de MMP9 plus élevées dans le thrombus en comparaison à celles de la paroi (Fontaine et al, 2002). Ces cellules et l'activité du thrombus se situent essentiellement à la partie intraluminale. L'interaction du thrombus luminal avec le sang circulant en ferait une source de biomarqueurs de l'AAA (Touat et al, 2006). Une autre participation du thrombus à la progression de l'AAA est mécanique avec la modification de flux et des contraintes de cisaillement (Wilson et al, 2013).

1.2.4 Phénomènes de convection

L'importance du thrombus est réaffirmée par l'hypothèse du phénomène de convection. Ce phénomène consiste en un transfert passif de molécules par un fluide. Ce phénomène dans l'AAA est forcé par la circulation sanguine. Du fait de la corrélation entre le thrombus et l'expansion anévrysmale et de la fragilisation pariétale, Adolph et al (1997) ont étudié la composition et la perméabilité du TIL. Des canaux multiples au sein du thrombus permettraient la progression des cellules vers la paroi. De même dans cette étude, la perméabilité du thrombus a été mesurée comme étant plus importante que dans la paroi artérielle normale. A l'inverse, la présence du thrombus a été corrélée à l'hypoxie de la paroi aortique, pouvant induire une fragilisation pariétale (Vorp et al, 2001). Dans cette étude réalisée chez l'Homme, la mesure peropératoire de l'oxygénation de la paroi aortique anévrysmale en regard d'un thrombus de plus de 4 mm d'épaisseur était significativement diminuée par rapport à celle observée dans la paroi d'AAA sans thrombus. En parallèle, l'analyse histologique révèle une néovascularisation adventitielle augmentée et une fragilisation pariétale dans les zones hypoxiques (Vorp et al, 2001). Dans les biopsies anévrysmales humaines, une corrélation inverse est retrouvée entre la présence de cellules inflammatoires, essentiellement les lymphocytes de type B et T et les macrophages, la présence de néovaisseaux et la diminution de l'expression de collagène et d'élastine (Reeps et al, 2009). Les néovaisseaux seraient une source de MMPs et participeraient donc à la fragilisation pariétale (Reeps et al, 2009).

I.3 Biomarqueurs

La pathologie anévrysmale est une pathologie complexe au cours de laquelle de nombreuses cellules et de nombreux processus biologiques interviennent. Le dépistage par une échographie a montré ces limites en terme de coût (Svensjo et al, 2014) et de participation

de la population à dépister (Linné et al, 2014). Les biomarqueurs, dosables dans les échantillons sanguins, sont donc une piste intéressante pour le dépistage de cette pathologie.

1.3.1 Définition

Selon Becker, un biomarqueur peut être défini comme une cellule, une protéine, un peptide, un gène ou un métabolite qui représente des processus biologiques dans un organisme à un instant donné (Becker et al, 2007). Le terme biomarqueur a été introduit en 1989 en tant que terme *Medical Subject Headings* (MeSH) et redéfini en 2001 par le *National Institute of Health* (NIH) comme un paramètre objectivement mesurable et évalué comme indicateur d'un processus biologique normal, de processus pathologiques ou de réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique (Vasan et al, 2006). Le biomarqueur doit permettre d'améliorer la prise en charge des patients et être identifiable par des techniques acceptables pour le patient.

1.3.2 Les biomarqueurs actuels de l'AAA

Aucun biomarqueur de l'AAA n'est utilisé à l'heure actuelle en pratique clinique. De nombreux marqueurs ont cependant été retrouvés lors des études génétiques, des analyses des ARN messagers (ARNm) et des protéines. La table 1 résume les données des principales revues de la littérature sur les biomarqueurs étudiés chez l'Homme dans l'AAA de 1985 à 2014 (Golledge et al, 2008; Urbonavicius et al, 2008; Moxon et al, 2010; Moris et al, 2014), à l'exception des données de GWAS qui seront exposées dans la table 3.

Table 1 - Récapitulatif des principaux biomarqueurs détectés dans le plasma de patients porteurs d'AAA

Catégorie	Biomarqueur	Nombre de patients inclus	Valeur clinique	Concentration plasmatique chez les patients AAA	Référence
Marqueurs de la MEC homéostasie ou protéolyse	Propeptide carboxyterminal du procollagène de type 1	177	Diagnostic	Augmentée	Satta et al, 1995
	Propeptide aminoterminal du procollagène de type 3	139	Expansion	Augmentée	Satta et al, 1997
	Tenascine X	173	Prédictif	Augmentée	Zweers et al, 2006
	Cystatine C	142	Expansion et rupture d'AAA	Diminuée	Lindholt et al, 2001
	Cathepsine S	676	Expansion et taille d'AAA	Augmentée	Lv et al, 2012
	Fragments circulants de membrane basal	20	Diagnostic	Augmentée	Ramazani et al, 2011
	Ostéoprogérine	329	Diamètre AAA	Augmentée	Koole et al, 2012
	MMP9	39	Diagnostic	Augmentée	McMillian et al, 1999
	MMP3 et Inhibiteur tissulaire de MMP1	53	Diagnostic	Augmentée	Nakamura et al, 2000
Marqueurs de TIL et de thrombose	Fibrinogène	6386	Diagnostic	Augmentée	Singh et al, 2001
	D-dimère	187	Diagnostic	Augmentée	Fowkes et al, 2006
	Complexe protéine C activée - inhibiteur de protéine C	273	Diamètre AAA	Augmentée	Sofi et al, 2005

	Homocystéine	876	Diagnostic	Augmentée	Spark et al, 2003
	Activateur de plasminogène tissulaire (t-PA)	142	Diagnostic	Augmentée	Qian et al, 2008
	Inhibiteur 1 du t-PA	876	Diagnostic	Augmentée	Spark et al, 2003
	Pasmine-antiplasmine	187	Diagnostic	Augmentée	Fowkes et al, 2006
	PRDX-1	194	Diagnostic	Augmentée	Martinez-Pinna et al, 2011
	NGAL	235	Diagnostic	Augmentée	Ramos-Mozo et al, 2012
	IGF 1	3981	Expansion	Augmentée	Yeap et al, 2012
	IGF BP 1	149	Diagnostic et présence de TIL	Augmentée	Ramos-Mozo et al, 2012
Marqueurs génétiques	HLA-DQA1	813	Prédictif	SNP	Tromp et al, 2006
	Interleukine 10	793	Prédictif	SNP	Bown et al, 2007
	TIMP2	91	Prédictif	SNP	Hinterseher et al, 2010
	Longueur des télomères	32	Diagnostic	Diminué	Wilson et al, 2008
Marqueurs de l'inflammation	CRP ultrasensible	435	Expansion	Augmentée	De Haro et al, 2012
	sTWEAK	70	Diagnostic et expansion	Augmentée	Martin-Ventura et al, 2011
	Interleukine 6	53	Diagnostic	Augmentée	Dawson et al, 2007
	Tumor necrosis Factor alpha	130	Diagnostic	Augmentée	Juvonen et al, 1997
	Interféron gamma	130	Diagnostic	Augmentée chez les femmes	Juvonen et al, 1997
	Ostéopontine	198	Diagnostic	Augmentée	Golledge et al, 2007

	Marqueurs des lymphocytes T: CD28 soluble, CD86 soluble et ligand de CD 86 soluble	314	Diagnostic	Augmentée	Sakthivel et al, 2007
	Lymphocytes T CD4+ CD25+FOXP3+	65	Diagnostic	Augmentée	Yin et al, 2010
	Monocytes CD16+	104	Diamètre AAA	Augmentée	Ghigliotti et al, 2013
	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (ICAM 1)	105	Diagnostic	Augmentée	Blann et al, 1998
Lipoprotéines	Cellules progénitrices CD 34+	24	Diagnostic	Augmentée	Van Spyk et al, 2013
	Lipoprotéine (a)	876	Diagnostic	Augmentée	Spark et al, 2003
	LRP1	7301	Diagnostic	Diminuée	Bown et al, 2011
Marqueurs métaboliques	LDL HDL	9079	Diagnostic	Augmentée Diminuée	Takagi et al, 2010
	Taux d'hémoglobine	202	Prédictif	Diminuée	Martinez-Pinna et al, 2014
	Céruleplasmine	132	Diagnostic	Augmentée	Lindblad et al, 2005
	Protéine de liaison à la vitamine D	-	Diagnostic	Diminuée	Gamberi et al, 2011
	Vitamine D	4233	Diagnostic	Diminuée	Wong et al, 2011
	Glycosylphosphatidylinositol-spécifique phospholipase D	-	Diagnostic	Augmentée	Wallinder et al, 2012

1.3.3 Recherche de biomarqueurs

Afin de mettre en évidence des biomarqueurs de la pathologie anévrysmale de l'aorte abdominale sous-rénale, deux approches peuvent être utilisées, une approche ciblée d'une part et une approche sans *a priori* d'autre part.

L'approche ciblée est définie par l'étude d'un marqueur d'intérêt correspondant au biomarqueur potentiel. Le biomarqueur est sélectionné sur les bases d'une fonction biologique, de sa localisation tissulaire ou de sa participation à un processus biologique d'une autre pathologie et son action testée dans la pathologie d'intérêt. Les constatations histologiques de la destruction de la media, de l'infiltrat inflammatoire et de la destruction de l'élastine amènent à rechercher dans la circulation des marqueurs liés à la protéolyse, à l'inflammation et à la thrombose entre autres. Ainsi, de nombreuses cohortes de patients ont été analysées pour découvrir de nouveaux marqueurs sanguins de l'AAA. Pour exemple, MMP9, qui participe à la protéolyse de la matrice extracellulaire, a été retrouvée surexprimée dans le plasma de 121 patients présentant un AAA (Lindholt et al, 2000). Une autre étude sur l'expression plasmatique de MMP9 dans le plasma de 22 patients présentant un AAA et de 17 patients athérosclérotiques et sains sans AAA confirme l'origine de cette surexpression par l'étude du surnageant de cultures de 10 tissus d'AAA humain comparés à 5 tissus aortiques athérosclérotiques et 7 tissus aortiques de donneurs sains (McMillan et al, 1999).

La mise en évidence des MMPs dans l'AAA dans le plasma et dans le tissu a été complétée par une analyse du rôle des MMPs dans l'AAA. L'analyse de 32 AAA humains dont 15 AAA rompus a permis de mettre en évidence l'augmentation de la dégradation du collagène dans la paroi aortique (Abdul-Hussien et al, 2007). L'augmentation de cette dégradation est accompagnée de la surexpression des MMP-8,-9 et des cathepsines K, L et S activées (Abdul-Hussein et al, 1997). Les MMPs sont donc devenues une cible thérapeutique potentielle. Leur action est inhibée par les tétracyclines, telles que la doxycycline (Golub et al, 1983). Le

traitement par doxycycline diminue la croissance de l'AAA induit chez la souris par le chlorure de calcium (Prall et al, 2002). Chez l'Homme, l'analyse tissulaire révèle la diminution de l'expression de MMP9 exprimée dans les macrophages et l'activation de la MMP2 dans l'AAA dans 15 AAA prélevés lors d'une chirurgie à l'issue d'un traitement de 3 semaines par doxycycline (Curci et al, 2000). L'efficacité du traitement par doxycycline sur la croissance de l'AAA a été analysée chez 36 patients traités pendant 6 mois avec l'absence de modification du diamètre de l'AAA et une diminution du taux plasmatique de MMP9 (Baxter et al, 2009). Le ralentissement de la croissance de l'AAA par le traitement pendant 3 mois par doxycycline contre placebo a été observée jusqu'à 18 mois dans une population de 32 patients (Mosorin et al, 2001). Ce traitement au long cours est associé à des effets secondaires empêchant son utilisation en routine.

La stratégie d'analyse des MMPs illustre l'intérêt du marqueur dans la compréhension de l'AAA et son utilité thérapeutique. Toutefois, MMP9 reste un marqueur controversé de l'AAA puisque de nombreuses études ne mettent pas en évidence de modulation de MMP9 dans l'AAA (Eugster et al; 2005; Van Laake et al, 2005). Au laboratoire, l'étude sur les deux sous-types de macrophages isolés par LMD de biopsies AAA a montré que la MMP9 n'est pas spécifiquement exprimée dans un sous-type de macrophages et qu'il n'y avait aucune différence d'expression dans le plasma de patients avec un AAA comparés à des patients sans AAA (Boytard et al, 2013).

Une autre approche consiste en l'analyse du tissu aortique pour mettre en évidence des marqueurs circulants. La surexpression de l'interleukine 6, marqueur de l'inflammation, a été découverte par l'analyse protéomique par criblage sur puce de 10 tissus anévrysmaux comparés à 9 tissus aortiques sains chez l'Homme suggérant un potentiel de marqueur de l'AAA (Middleton et al, 2007). Ce potentiel est confirmé par une étude montrant une surexpression d'interleukine 6 dans le plasma de 27 patients présentant un AAA et 9

présentant un anévrisme thoracique comparés à 15 patients contrôles sans AAA (Dawson et al, 2007).

L'approche sans *a priori* permet d'identifier à partir de criblage génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique ou lipidomique de nombreux candidats potentiels (Vasan et al, 2006). Le développement de cette stratégie est la conséquence des nouveaux outils de criblage tels que les puces (Quackenbush et al, 2006) et les méthodes de séquençage (Wang et al, 2009). Comparée à l'approche ciblée, l'approche sans *a priori* offre la possibilité de mettre en évidence des candidats qui peuvent rester inconnus par l'approche ciblée. Un autre argument avancé plus spécifiquement dans l'AAA est l'intérêt dans l'approche sans *a priori* d'étudier toute sa complexité. De nombreux processus sont en effet impliqués dans l'AAA et la modulation d'une molécule unique analysée dans une analyse ciblée semble être insuffisante pour expliquer et diagnostiquer précisément un AAA (Moxon et al, 2010).

Tout en cherchant à mieux comprendre cette pathologie, l'intérêt du biomarqueur identifié dans les biofluides peut constituer un élément diagnostique également. Les étapes précliniques et cliniques en vue de ce marqueur diagnostique sont résumées dans la table 2.

Table 2 - Phases de développement d'un biomarqueur

Phase 1 DECOUVERTE	Identification par des études exploratoires d'un candidat, potentiel biomarqueur
Phase 2 VALIDATION	Analyse de la capacité du biomarqueur à différencier les patients sains des patients malades
Phase 3 PRECLINIQUE	Évaluation de la capacité du biomarqueur à diagnostiquer les patients malades en comparaison avec l'outil diagnostique de référence
Phase 4 PROSPECTIVE	Évaluation de la sensibilité et la spécificité du biomarqueur à l'aide d'une cohorte
Phase 5 IMPACT	Intérêt du dépistage à l'aide du biomarqueur sur la morbidité et mortalité liée à la pathologie

1.3.4 Les cibles candidates

1.3.4.1 Les gènes

Les gènes sont étudiés dans la pathologie anévrysmale et notamment dans le cas d'AAA familiaux ou secondaire à une maladie du tissu conjonctif, telle que la maladie de Marfan et la maladie d'Ehler-Danlos. L'analyse génétique de jumeaux quantifie l'héritabilité ou la proportion de variance attribuable au facteur génétique des AAA jusqu'à 70% (Wahlgren et al, 2010). Deux loci issus de populations familiales ont été associés à l'AAA, les chromosomes 4q31 et 19q13 (Shibamura et al, 2004 - Van Vlijmen-Van Keulen et al, 2005). Le loci 19q13 a permis de mettre en évidence un polymorphisme du gène codant pour la kallikréine 1, impliquée dans l'inflammation de l'AAA (Biros et al, 2011). Les travaux réalisés au laboratoire vont dans ce sens par la mise en évidence de la modulation de la kallistatine par une analyse protéomique différentielle par spectrométrie de masse quantitative de 17 plasmas de patients ayant un AAA et 17 plasmas de patients contrôles. En effet, la kallistatine interagit avec la kallikréine en l'inhibant (Acosta-Martin et al, 2011).

L'identification de gène marqueur de l'AAA peut permettre l'identification de plusieurs acides ribonucléiques (ARNs) codants et de protéines également candidates comme biomarqueurs. Les gènes constituent l'origine des modifications au cours d'une pathologie et les acteurs en aval du gène sont nombreux du fait d'un épissage alternatif et des modifications post-traductionnelles. L'étude des gènes candidats a mis en évidence environ 100 associations génétiques pour l'AAA en utilisant la méthode du polymorphisme de nucléotide isolé ou SNP (Hinterseher et al, 2011).

L'étude génétique en GWAS a permis d'obtenir des informations concernant le processus pathologique de l'anévrysme. Les gènes retrouvés par l'analyse en GWAS dans l'AAA sont résumés dans la table 3. Le polymorphisme du gène situé en 9p21 associé à la présence de l'AAA est associé à LRP 1 (Bown et al, 2011).

Table 3 - Gènes impliqués dans l'AAA mis en évidence en GWAS

Locus	Gènes de proximité (gene symbol)	Patients testés (AAA/contôles)	Référence
3p12.3	Contactine 3 (CNTN3)	123/112	Elmore et al, 2009
9p21.3	CDKN2B RNA antisense 1 (CDKN2BAS1)	2 836/16 732	Helgadóttir et al, 2008
9q33.1	DAB2 interacting protein (DAB2IP)	1292/30 503	Gretarsdóttir et al, 2010
12q13.3	LDL receptor-related protein 1 (LRP1)	1866/5435	Bown et al, 2011

I.3.4.2 Les protéines

Les protéines représentent l'aboutissement de l'expression du gène. Les protéines participent aux processus cellulaires. Elles sont soumises à de nombreuses modifications appelées modifications post-traductionnelles. Ces modifications peuvent varier dans les états pathologiques pouvant aller jusqu'à l'absence d'expression. Les protéines, étudiées et évoquées comme biomarqueurs de l'AAA, ont leur intérêt du fait des possibilités de détection notamment en routine dans la pratique clinique (ELISA, Western-Blot). Les protéines sont dosables par prélèvements sanguins en routine pour certaines, telles que la CRP ultrasensible qui est retrouvée surexprimée dans le plasma des patients AAA comparés aux patients sans AAA et est donc évoquée comme biomarqueur de l'AAA (De Haro et al, 2012).

Au laboratoire, une analyse protéomique différentielle a été menée sur les CML, les macrophages et dans le plasma issus de la population *Lille Aneurysmal Study* ou LILAS. Les patients inclus dans LILAS sont 24 patients présentant un AAA et 18 patients athérosclérotiques ne présentant pas d'AAA. Le diagnostic d'AAA était confirmé ou éliminé par imagerie pour tous les patients (Lamblin et al, 2010). Les cellules vasculaires ont été mises en culture pour réaliser une analyse transcriptomique et protéomique selon les

techniques décrites dans le laboratoire (Dupont et al, 2004 - Dupont et al, 2005). L'analyse transcriptomique a été réalisée sur puces à ARN et l'analyse protéomique par électrophorèse 2D-DIGE et identification par spectrométrie de masse. L'expression différentielle des protéines sélectionnées de ces analyses a été évaluée dans les cellules vasculaires et le plasma par une analyse sur puce. Ainsi, neuf protéines issues de ces analyses sont différentiellement exprimées dans les macrophages et dans les CML issus des AAA comparés à ceux des patients athérosclérotiques. De ces neuf protéines, TIMP 3 et deux désintégrines et métalloprotéinases avec des motifs thrombospondine (ADAMTS) 5 et ADAMTS 8 sont exprimées différentiellement dans le plasma (Pinet et al, 2011). Ces protéines issues de l'analyse différentielle des cellules vasculaires de l'AAA ont donc un potentiel de biomarqueur de l'AAA. De cette analyse est issue la peroxiredoxine-1 qui était retrouvée surexprimée dans les macrophages et le plasma issus des patients AAA (Lamblin et al, 2010). Dans l'étude des macrophages de type 1 et 2 localisés et isolés du tissu anévrysmal chez l'Homme, la peroxiredoxine-1 est retrouvée exprimée principalement dans les macrophages de type M1 permettant de mettre en évidence l'origine cellulaire de la surexpression de la peroxiredoxine-1 dans le plasma des patients AAA (Boytard et al, 2013).

Les protéines étant sécrétées en extracellulaire, une méthode d'analyse des protéines une fois sécrétées a été développée. Les tuniques d'aortes saines et AAA sont éventuellement séparées ou le tissu est analysé dans sa totalité. Les échantillons d'aorte sont incubés dans des antibiotiques et antimycotiques suivant les techniques de culture cellulaire et le surnagent du milieu d'incubation est récupéré afin d'en analyser les protéines excrétées par les tissus. Ainsi, ces milieux conditionnés ont permis de mettre en évidence l'*Insulin Growth Factor Binding Protein 1* évoqué dans la table 1 comme biomarqueur potentiel de l'AAA (Ramos-Mozo et al, 2012).

I.3.4.3 Les ARNs non codants

Plus récemment, une nouvelle classe d'éléments régulateurs de la transcription et traduction des protéines a été identifiée correspondant aux ARNs non codants. En effet, seuls 2% de l'acide désoxyribonucléique (ADN) sont transcrits en ARNm, le reste constituant les ARNs non codants.

Les premiers ARNs non codants identifiés sont les microARNs (miARNs). L'identification du premier miARN, lin-4, a été réalisée chez un nématode, *Caenorhabditis Elegans* (Lee et al, 1993). Les miARNs sont très conservés au cours de l'évolution et entre les espèces (Pasquinelli et al, 2000). Chez l'Homme, plus d'un millier de miARNs sont décrits (Small et al, 2010). D'autres éléments ont ensuite enrichis la famille des ARNs non codants tels que les ARNs longs non codants (lnc ARNs) (Kapranov et al, 2007). La découverte des ARNs non codants a ouvert un large champ pour la recherche de biomarqueurs. Les miARNs sont des ARNs simples brins de 19 à 25 nucléotides. Leur transcription est régulée dans le noyau par les facteurs de transcription et requiert l'action de la RNase polymérase II et de Dicer produisant un ARN double brin de 19 à 25 nucléotides. L'ARN double brin est incorporé au complexe RNA-induced silencing complex (RISC). Le seul brin restant dans ce complexe permet son action sur les ARN messagers en inhibant la transcription ou en dégradant les ARN messagers (Winter et al, 2009). La maturation des miARNs est résumée Figure 5.

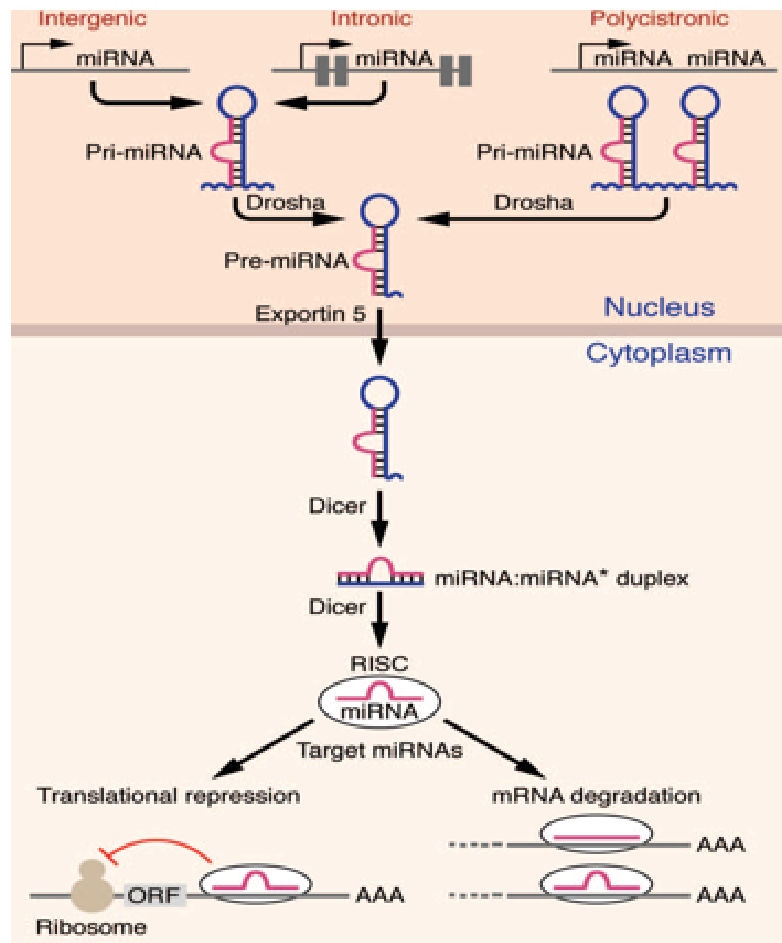


Figure 5 - Maturation des miARNs (Van Rooij et al, 2011).

De même, les lnc ARNs, de taille plus importante de 2 à plus de 100 kilobases, semblent avoir différents rôles au sein de la cellule (Taft et al, 2009).

Leur rôle de régulation s'exerce à de nombreux niveaux. Les miARNs agissent notamment dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle (Taft et al, 2010). L'action principale des lnc ARNs non codants reste la régulation épigénétique des gènes codants (Moran et al, 2012).

La détection des ARNs non codants dans les biofluides et leurs interactions avec les ARNs messagers et l'ADN en font des régulateurs fondamentaux dans les processus biologiques et notamment pathologiques (Taft et al, 2010). L'interaction indirecte entre les protéines et les ARNs non codants est importante. Les ARNs non codants ont un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle et ainsi sur l'expression protéique. La recherche de biomarqueurs peut donc

être complétée et enrichie par les analyses bioinformatiques mettant en évidence les cibles et interactions des ARNs non codants, miARNs et lnc ARNs (Peterson et al, 2014).

Le potentiel thérapeutique des miARNs est également évoqué (Van Rooij et al, 2012). La difficulté dans le développement des miARNs comme cible thérapeutique est la sécurité et l'aspect économique. De nombreux miARNs sont aux centres des considérations cliniques et sont exposés dans la table 4 (Van Rooij et al, 2012). L'inhibition des miARNs par des anti-miRs ou antagomiRs est en développement. Le Miravirsén est un anti-miR-122 administré en sous-cutané dont l'innocuité à 36 mois chez 36 patients atteints d'une infection par le virus de l'hépatite C a été démontrée (Van der Ree et al, 2014).

Table 4 - Les miARNs d'intérêt clinique en cours d'évaluation thérapeutique

MiARN	Pathologie	Molécule thérapeutique	Espèces évaluées	Références
miR-122	Hépatite C	LNA-anti miR	Souris Primates	Elmén et al, 2008(a,b)
miR-208	Remodelage cardiaque	LNA-anti-miR	Souris	Montgomery et al, 2011
miR-155	Inflammation	LNA-anti-miR	Souris	Worm et al, 2009
miR-21	Fibrose	Anti-miR	Souris	Thum et al, 2008
miR-451	Syndrome myéloprolifératif	Mutation	Souris	Patrick et al, 2010
miR-33	Athérosclérose	LNA-anti-miR	Souris Primates	Rainer et al, 2011 (a,b)
miR-15	Cicatrisation du muscle cardiaque	LNA-anti-miR	Souris Porc	Hullinger et al, 2012
miR-92a	Néoangiogénèse	Anti-miR	Souris	Bonauer et al, 2009
miR-103/107	Diabète de type 2	Anti-miR	Souris	Trajkovski et al, 2011

Les ARNs non codants représentent une source importante de biomarqueurs et permettent une analyse intégrée avec les autres systèmes biologiques par leurs nombreuses interactions avec l'ADN, les ARNm et les protéines.

I.4 Choix des modèles et échantillons analysés

I.4.1 Modèles animaux

Dans la recherche sur l'AAA, les modèles animaux ont été développés et souvent utilisés. Les modèles animaux permettent d'accéder au tissu AAA et au tissu contrôle en limitant la variabilité interindividuelle. Les modèles animaux permettent également de comparer les données plasmatiques à différent temps et de les corrélérer avec le tissu pathologique. Il existe plusieurs modèles. Trois modèles induisent l'AAA par des perfusions d'agents chimiques: la perfusion d'élastase après clampage (Anidjar et al, 1992); la diffusion de chlorure de calcium par une compresse imbibée apposée sur la paroi aortique (Chiou et al, 2001) et l'infusion d'angiotensine II sous-cutanée diffusée par des minipompes (Rush et al, 2009). L'inflammation de l'AAA est reproduite mais le dernier modèle ne permet pas d'obtenir de dégradation de la media mais est le seul à permettre la formation d'un thrombus (Trollope et al, 2011). Les souris KO décrites par Piedrahita et al (1992) permettent l'étude de voies biologiques spécifiques et peuvent être associées aux modèles précédents. Les modèles "mécaniques" de l'AAA requièrent la mise en place de patch aortique ou la création d'une sténose aortique (Molacek et al, 2009), le remplacement de l'aorte sous-rénale par une aorte en provenance d'une autre espèce (Allaire et al, 1994). L'ensemble des modèles animaux est résumé dans la table 5.

Table 5 - Modèles animaux de l'AAA

Méthodes		Description	Histologie	Référence
<i>Perfusion d'agents chimiques</i>	Élastase	Clampage d'aorte sous-rénale avec perfusion d'élastase pendant 2h	Dégradation de la media Inflammation	Anidjar et al, 1992
	Chlorure de Calcium	Application d'une gaze imbibée de chlorure de calcium	Dégradation de la media Inflammation	Chiou et al, 2001
	Angiotensine II	Infusion continue d'angiotensine II par un dispositif de pompes sous-cutanées	Inflammation Thrombus	Rush et al, 2009
<i>Modèles mécaniques</i>	Flot turbulent	Induction d'une sténose par ligature non sténosante	Dégradation de la media Inflammation Thrombus	Molacek et al, 2009
	Patch veineux	Aortotomie et fermeture par patch d'élargissement veineux	Dégradation de la media Inflammation	Molacek et al, 2009
	Xénogreffe	Grefe d'aorte provenant d'un autre animal	Dégradation de la media Inflammation	Allaire et al, 1994
<i>Modèles génétiques</i>	Mutation d'un gène cible	Éventuellement associé à d'autres modèles d'AAA	Dégradation de la media Athérosclérose	Piedrahita et al, 1992

Le modèle animal de l'AAA est un modèle *in vivo* permettant d'obtenir des analyses de biofluides et tissulaire en quantité suffisante. Il s'agit également d'un modèle préclinique potentiel pour l'évaluation de l'efficacité et des effets secondaires d'une thérapeutique (Alsac et al, 2013). Toutefois, comme cela est évoqué, les modèles animaux sont incomplets dans leur représentation de l'AAA (Davies et al, 1998). L'analyse histologique des tissus d'AAA illustre cela notamment par l'absence d'ILT, acteur majeur de l'AAA, dans de nombreux modèles animaux. Pour améliorer la fiabilité des résultats issus du modèle animal, des équipes

analysent les résultats dans trois modèles animaux différents (Maegdefessel et al, 2012). Le modèle humain d'AAA n'a pu être reproduit par le modèle animal du fait de sa complexité.

I.4.2 Échantillons d'origine humaine

L'AAA chez l'Homme peut être étudié soit au niveau du tissu soit au niveau des biofluides prélevés en accord avec la déclaration d'Helsinki. En effet, le traitement chirurgical peut permettre d'obtenir un échantillon de tissu pathologique bien que la quantité de matériel disponible soit limitée par des raisons chirurgicales.

I.4.2.1 Les biopsies anévrysmales

Les analyses réalisables sur le tissu anévrysmal humain sont identiques à celles réalisables sur le tissu des modèles animaux. Le tissu peut être soumis à une analyse histologique. L'immunomarquage permet d'étudier l'architecture de l'AAA d'une part et de localiser des marqueurs protéiques dans l'AAA. Ainsi, l'analyse histologique a permis de révéler la diminution de la densité en CML dans la media de l'AAA (López-Candales et al, 1997). La présence de MMP9 est localisée par immunohistochimie précisément dans les neutrophiles situés à la partie luminale du TIL (Fontaine et al, 2002) et la MMP2 est sécrétée par les cellules mésenchymateuses (Davis et al, 1998). L'immunofluorescence permet d'analyser de façon plus précise d'éventuelles interactions entre les protéines et de mettre en évidence des colocalisations (Zhou et al, 2007). L'hybridation *in situ* est le moyen de localiser des marqueurs d'intérêt d'ADN, d'ARN et de miARN sur une coupe histologique d'AAA et d'analyser d'éventuelles interactions par colocalisation avec leurs cibles (Nuovo, 2010).

L'analyse tissulaire peut également permettre l'analyse du matériel génomique, transcriptomique ou protéique sans maintenir l'architecture du tissu. L'extraction de l'ARN et des protéines permet d'analyser l'expression de marqueurs potentiels dans l'AAA. Cette extraction peut venir du tissu anévrysmal sans le thrombus (Irrizarri et al, 1993), de la totalité

du tissu sans différenciation de la paroi et du thrombus (Tamarina et al, 1997). D'autres effectuent une distinction du thrombus et de la paroi-même pour les comparer (Coutard et al, 2010).

Ces analyses tissulaires ne distinguent pas les nombreuses cellules impliquées dans la paroi de l'AAA. Afin d'étudier l'expression protéomique ou transcriptomique des cellules vasculaires de l'AAA, l'analyse des cellules peut être réalisée *in vitro* comme cela est fait pour les CML mises en culture dans des milieux conditionnés d'AAA (Ehrlichman et al, 2010). Les cellules en culture peuvent être transfectées afin de moduler l'expression d'une cible et en établir le mécanisme d'action spécifique sur la cellule et par extension sur l'AAA. Cette transfection peut également être pratiquée sur le modèle *in vivo* et ainsi évaluer les conséquences *in vivo* et *in vitro* de la molécule testée sur l'AAA (Xiong et al, 2008). Une autre méthode consiste à mettre en culture les CML issues du tissu aortique pathologique comme cela a été décrit dans le modèle animal (Battle et al, 1994) et chez l'Homme (Dupont et al, 2005). Les cellules peuvent également être isolées par microdissection laser (LMD) permettant une analyse transcriptomique et protéomique des cellules isolées sans risque de modification phénotypique des cellules (Chimenti et al, 2005).

I.4.2.2 Le plasma des patients présentant un AAA

Le plasma prélevé chez des patients présentant un AAA peut également être obtenu en accord avec la déclaration d'Helsinki. Le matériel peut être obtenu en plus grande quantité du fait du prélèvement moins invasif. L'étude du plasma issu des patients AAA est particulièrement intéressante pour la recherche de biomarqueurs circulants dans l'AAA (Golledge et al, 2008). Une analyse de l'expression de marqueurs potentiels comparée à une population contrôle peut mettre en évidence une modulation pouvant permettre le diagnostic ou le suivi ou le pronostic d'AAA mais également, comme illustré précédemment pour MMP9, permettre une meilleure compréhension de l'AAA (cf. I.3.3 - Recherche de

biomarqueurs). Le plasma permet d'isoler des cellules circulantes des patients porteurs d'un AAA et de les mettre en culture afin d'en analyser leur profil d'expression comme cela a été réalisé au laboratoire pour les monocytes différenciés en macrophages (Lamblin et al, 2010). L'expression protéique et transcriptomique ont ainsi été comparées entre les macrophages issus de patients AAA et de patients contrôles.

I.4.2.3 Le choix des contrôles

Le choix de la population contrôle est primordial. Le tissu contrôle peut être prélevé chez le même patient mais proviendra d'une autre localisation comme l'artère mésentérique inférieure (Liao et al, 2000) ou proviendra d'un patient différent induisant dans l'analyse une variabilité interindividuelle. Lorsque le tissu est prélevé chez un autre patient, la variabilité du conditionnement et de la préservation peut différer si le tissu aortique contrôle est prélevé au cours de prélèvements multi organes. Une autre limite du tissu aortique non pathologique est l'absence de cellules inflammatoires dans la paroi pouvant servir de contrôle aux cellules inflammatoires de l'AAA. Le prélèvement des patients contrôles peut également être réalisé au cours d'une chirurgie de l'aorte dans le cadre d'une athérosclérose occlusive (Newman et al, 1994). Toutefois, les traitements chirurgicaux de la pathologie occlusive aortique ne nécessitent pas d'ablation du tissu aortique et peuvent donc rendre ce matériel rarement accessible et à risque pour le patient traité.

La population contrôle décrite pour les AAA est la population de patients souffrant d'une athérosclérose occlusive afin de limiter la mise en évidence dans l'analyse des marqueurs liés aux facteurs de risque communs pour ces deux populations (Thompson et al, 2002).

Au sein du laboratoire, une biobanque de tissus AAA et de tissu d'aorte provenant de donneurs d'organe sans AAA et rarement athérosclérotiques du fait de leur âge a été constituée grâce à la collaboration des services de Chirurgie vasculaire et de Chirurgie digestive et Transplantation du CHRU de Lille (Protocole PFS 11-004 avec l'accord de

l'Agence de Biomédecine). Une biobanque de plasma a également été obtenue de patients présentant un AAA et de patients athérosclérotiques sans AAA dans le cadre de l'étude LILAS (Lamblin et al, 2010).

1.4.3 Intérêt d'étudier les cellules isolées de biopsies AAA

De nombreuses cellules sont impliquées dans le tissu anévrysmal avec des rôles spécifiques et des modifications au cours de la pathologie anévrysmale qui leur sont propres. L'AAA est décrit comme un modèle humain unique spatiotemporel de l'athéromatose (Michel et al, 2011). L'analyse du tissu entier risque de méconnaître des potentiels biomarqueurs. En effet, il a été montré que l'étude des cellules de l'AAA isolées permet de mettre en évidence des ARN messagers qui ne sont pas différentiellement exprimés lors de l'analyse du tissu global (Sho et al, 2005).

L'isolement des cellules est obtenu par LMD. Cette technologie permet de maintenir intact le phénotype des cellules isolées (Chimenti et al, 2005). Les cellules d'intérêt sont dans un premier temps identifiées par immunohistochimie sur le tissu congelé ou en paraffine. Après localisation des cellules d'intérêt, la zone à découper est dessinée par la main du manipulateur sur la coupe adjacente d'épaisseur 18 μm non marquée. L'AAA est un tissu morphologiquement hétérogène. De nombreux repères tels que des plaques facilitent la localisation de la zone d'intérêt sur la coupe adjacente non marquée. Une capsule, sur laquelle un film déformable par l'action du laser est posé, est ensuite avancée sur la zone dessinée. La microdissection par capture au laser consiste en des impulsions multiples de laser permettant l'accroche de la zone sur le film de la capsule déformé sous l'action du laser (Liotta et al, 2001). La zone d'intérêt est ainsi retenue sur le film. La surface microdisséquée peut être approximativement de la taille d'une cellule puisque le diamètre du faisceau varie de 7,5 à 30 μm (Figure 6). Toutefois, pour obtenir une quantité suffisante pour l'analyse protéomique ou transcriptomique, il est nécessaire de repérer des zones enrichies dans le même type cellulaire

pour une analyse fiable des marqueurs exprimés par un groupe de cellules. Les autres cellules vasculaires de l'AAA sont donc également localisées sur la coupe histologique afin d'éviter des zones comprenant plusieurs types cellulaires et qui fausserait l'analyse de l'origine des protéines ou ARNs extraits.

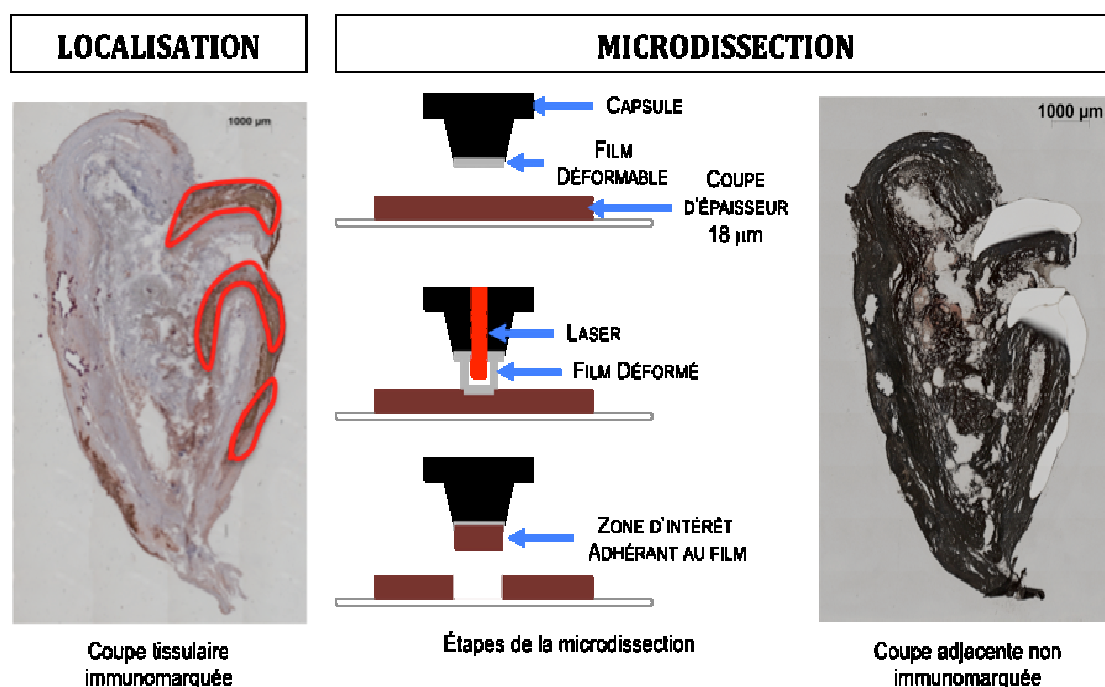


Figure 6 - Principe et représentation des étapes de microdissection laser par capture : la coupe immunomarquée (à gauche) permet de localiser la zone d'intérêt entourée en rouge. Le film de la capsule se déforme sous l'action du laser permettant l'adhésion de la zone d'intérêt. La coupe non marquée (à droite) adjacente a été découpée par le laser.

La microdissection laser permet d'étudier le protéome et le transcriptome des cellules isolées du tissu anévrysmal sans en modifier leur expression protéomique et transcriptomique (Chimenti et al, 2005). Cette méthode d'isolement des cellules permet d'éviter les modifications pouvant être occasionnées par la culture cellulaire ou par les conditions d'extraction des protéines (Acosta-Martin et al, 2009).

I.5 Méthodes d'analyse des miARNs

Le champ des miARNs a été développé sur une vingtaine d'années. De sa découverte à la mise en évidence de son potentiel de biomarqueur et à son potentiel thérapeutique moins de

20 ans sont passés (Figure 7). La RT-PCR est la méthode de quantification des miARNs de référence. Des méthodes de détection des miARNs ont été développées pour mettre en évidence des miARNs connus avec les puces à miARNs mais également de nouveaux miARNs avec le séquençage d'ARN.

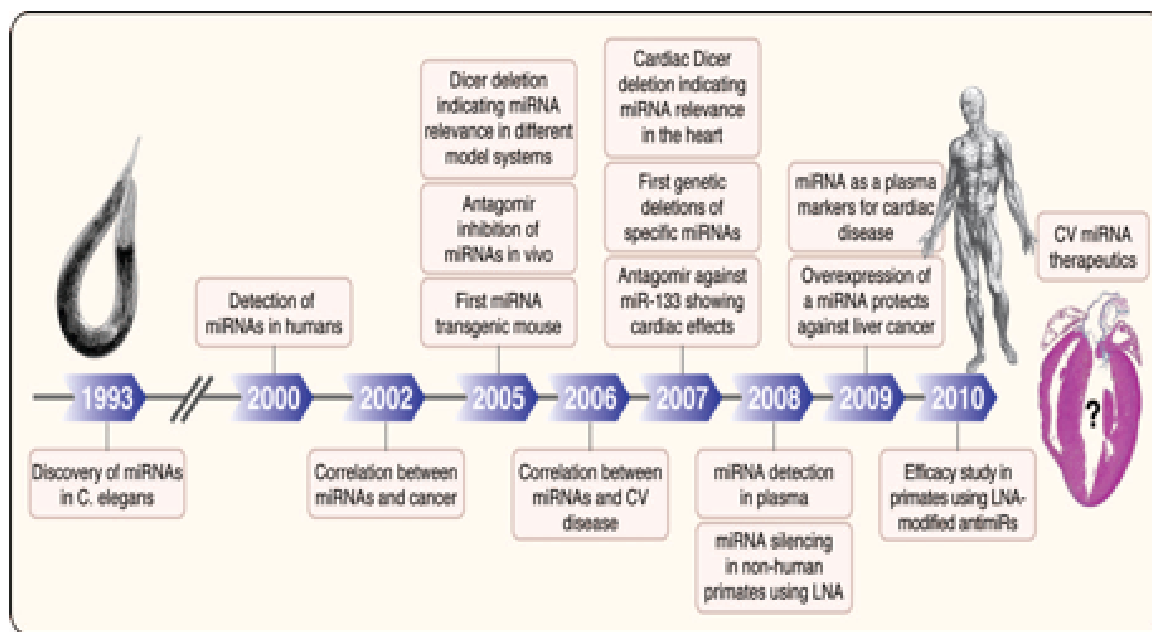


Figure 7 - Découvertes séquentielles dans le champ des miARNs (Van Rooij et al, 2011)

1.5.1 Rétrotranscription PCR (RT-PCR)

Utilisée comme méthode de criblage ou pour valider les résultats des méthodes de criblage, la RT-PCR est incontournable dans l'étude des miARNs. Le criblage par PCR est décrit comme très sensible jusqu'à une paire de base (Chen et al, 2005). Les miARNs n'ayant pas de queue de polyadénylation contrairement aux ARN messagers, la reconnaissance et la spécificité des amorces aux miARNs cibles a été améliorée par la forme en tête d'épingle des amorces contenant une séquence complémentaire à la séquence 3' du miARN (Van Rooij et al, 2011). Les amorces à tête d'épingle sont spécifiques des séquences de miARNs matures et évitent la fixation aux séquences de pre- ou pri-miARNs. Ainsi, la séquence complémentaire du miARN mature est édifiée. Le criblage par PCR nécessite une amplification des miARNs

permettant de dépasser les limites des petits échantillons (Kong et al, 2009). La validation des analyses sur puces par la méthode de qRT-PCR est recommandée (Koshiol et al, 2010). La RT-PCR quantitative (qRT-PCR) permet de valider sur de petits échantillons, l'analyse quantitative de l'expression des miARNs (Lu et al, 2005).

1.5.2 Les puces à miARNs

Les puces à miARNs ont été développées sur la base des puces à ADN et permettent de cribler l'expression des miARNs (Liu et al, 2008). Les petits ARNs représentant 0,01% des ARNs totaux, les échantillons peuvent être enrichis par des techniques d'électrophorèse ou de chromatographie afin d'obtenir la quantité d'ARN nécessaire (0,2 à 2 µg) à l'hybridation. Les puces contiennent une librairie de sondes en tête d'épingle permettant l'hybridation de miARNs aux séquences connues. Les puces évoluent avec la mise en évidence de nouveaux miARNs et offrent un profil incomplet des miARNs (Tromp et al, 2009). À l'heure actuelle, 1000 miARNs sont connus et peuvent être criblés par puce (Van Rooij, 2011). Les puces à miARNs permettent la détection de miARNs connus mais ne représentent pas une méthode de quantification fiable. Les puces permettent d'établir un profil d'expression d'un état pathologique comparé à un état physiologique (Ikeda et al, 2007).

L'hybridation des miARNs aux sondes nécessite une spécificité et une sensibilité importante. Pour cela, des techniques de modifications chimiques ou physiques sont pratiquées sur les sondes afin d'homogénéiser la température d'hybridation des sondes, pour augmenter la spécificité et la sensibilité. Les analogues 2'-O-methyl-2,6-diaminopurine and 2'-O-methyl-5-methyluridine augmentent l'intensité d'hybridation et les acides nucléiques verrouillés pour *Locked Nucleic Acid* (LNA) augmentent l'intensité d'hybridation et la sensibilité des sondes d'hybridation. Les sondes LNA à miARNs sont ainsi plus sensibles que les sondes à ADN. Parmi les sondes d'hybridation existent des sondes exogènes ou endogènes de contrôles internes et externes et des sondes de contrôles positifs et négatifs. Ces sondes

permettent la normalisation des résultats et l'intégration du bruit de fond dans l'analyse du signal ainsi que l'analyse différentielle des résultats entre puces. Elles sont également nécessaires pour vérifier la qualité de la procédure d'hybridation. Pour cette procédure, les miARNs sont "étiquetés" grâce à la T4 RNA-ligase par des molécules pouvant être des isotopes radioactifs ou des sondes fluorescentes telles que les cyanines. Les miARNs présents dans un échantillon biologique sont donc testés à partir d'une banque de miARNs connus et détectés par les sondes. Cette technique ne nécessite pas d'amplification des miARNs. L'analyse de l'expression des miARNs par puce devra être validée par des techniques de quantification par Northern blot ou "polymerase chain reaction" (PCR) (Yin et al, 2008).

Les résultats des puces ARNs nécessite des analyses bioinformatiques des données brutes extraites par le scanner de la puce hybridée et analysée par un logiciel spécifique de chaque constructeur (dans notre cas, Agilent Feature Extraction pour Agilent). Le signal émis par chaque sonde de miARNs de la puce est soumis à une analyse statistique spécifique par le logiciel R et à une modélisation linéaire par limma (Lopez-Romero, 2011).

1.5.3 Séquençage d'ARN

Toutefois, les méthodes de PCR et de puces détectent uniquement les miARNs connus, ainsi le séquençage des ARNs est une méthode de criblage complémentaire intéressante dans l'étude des miARNs mais également dans la détection d'autres ARNs non codants (Nielsen et al, 2010). Cette méthode offre une grande sensibilité et permet de détecter les miARNs absents sur les puces mais également de confirmer la présence de miARNs connus dans un échantillon. Cependant, cette analyse nécessite entre 2 à 10 microgrammes du fait des nombreuses étapes de purification. Une autre limite de cette procédure est le risque de ne pas séquencer les miARNs présents en faible abondance dans l'échantillon (Creighton et al, 2009).

D'autres méthodes existent pour analyser les miARNs soit pour la confirmation soit pour la découverte et le criblage des miARNs. Les différentes méthodes sont récapitulées dans la table 6.

Table 6 - Techniques d'analyse des miARNs et leurs limites (inspirée de Koshiol et al, 2010)

Technique	Sensibilité	Spécificité	But	Limites
Northern blot	+/-	+++	Confirmation	Complexe Radioactif Quantité d'échantillon
qRT-PCR	+++	+++	Confirmation	Amplification
Puces à miARNs	+	+	Confirmation	Quantité d'échantillon Hybridation croisée Mauvaise quantification
Hybridation in situ	+	+	Confirmation	Bruit de fond Forte expression
Cytométrie de flux basée sur les billes	++	+++	Confirmation	Étapes nombreuses Amplification
Clonage	+	+++	Découverte Confirmation	Coûteux Long Mauvaise quantification
Séquençage	+++	+++	Découverte Confirmation	Complexe Quantité et qualité de l'échantillon

Parmi les méthodes d'analyse des miARNs, la PCR reste la technique de référence de validation et quantification des miARNs (Van Rooij et al, 2011). Les puces à miARNs permettent d'établir un profil d'expression des miARNs dans un échantillon ciblé. Du fait de la nécessité d'une amorce complémentaire du miARN, la PCR et les puces limitent le champ d'analyse aux miARNs connus. La recherche sur les miARNs étant en expansion, les méthodes de criblage sont d'un intérêt majeur pour mettre en évidence des séquences non identifiées.

OBJECTIFS

II OBJECTIFS

II.1 Stratégie expérimentale

Durant ces travaux de thèse, deux stratégies ont été utilisées dans le but d'améliorer la compréhension de la pathologie anévrysmale et de découvrir de biomarqueurs potentiels. Une première stratégie consiste en l'étude d'une protéine candidate, ADAMTS 5, issue du criblage protéomique effectuée par l'équipe (Lamblin et al, 2010). Cette stratégie avait été précédemment validée en testant l'expression d'une protéine candidate, la peroxiredoxine 1, sur les macrophages M1 et M2. La seconde stratégie est sans *a priori* et consiste en un criblage des miARNs à partir des cellules impliquées dans l'AAA, isolées par LMD.

II.1.1 Protéines candidates issues du criblage protéomique

II.1.1.1 ADAMTS 5 et les CML

ADAMTS 5, une métalloprotéinase impliquée dans la dégradation des protéines de la MEC, a été mise en évidence par criblage protéomique et transcriptomique des CML en culture et du plasma des patients porteurs d'AAA comparés aux patients athérosclérotiques sans AAA (Lamblin et al, 2010). Cette protéine a été trouvée surexprimée chez les patients présentant un AAA. ADAMTS 5 est une enzyme qui dégrade les aggrecanes et versicanes présentes dans la MEC (Schaefer et al, 2010) et dont l'expression est retrouvée dans les CML (McCulloch et al, 2009). L'hypothèse de ce travail est qu'ADAMTS 5 sécrétée par les CML dans l'AAA entraînerait la dégradation de la MEC avec laquelle les CML interagissent dans la media. Les CML interagissant avec des protéines de structure matricielles dégradées se mettraient en apoptose selon le mécanisme d'anoïkis décrit (Michel, 2003). Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle, les CML anévrysmales produiraient ADAMTS 5 qui serait capable de dégrader la MEC, son expression a été étudiée dans les CML anévrysmales isolées par microdissection laser afin d'étudier son implication dans le détachement des CML de la MEC entraînant l'anoïkis (Michel, 2003). La stratégie expérimentale est résumée sur la Figure 8.

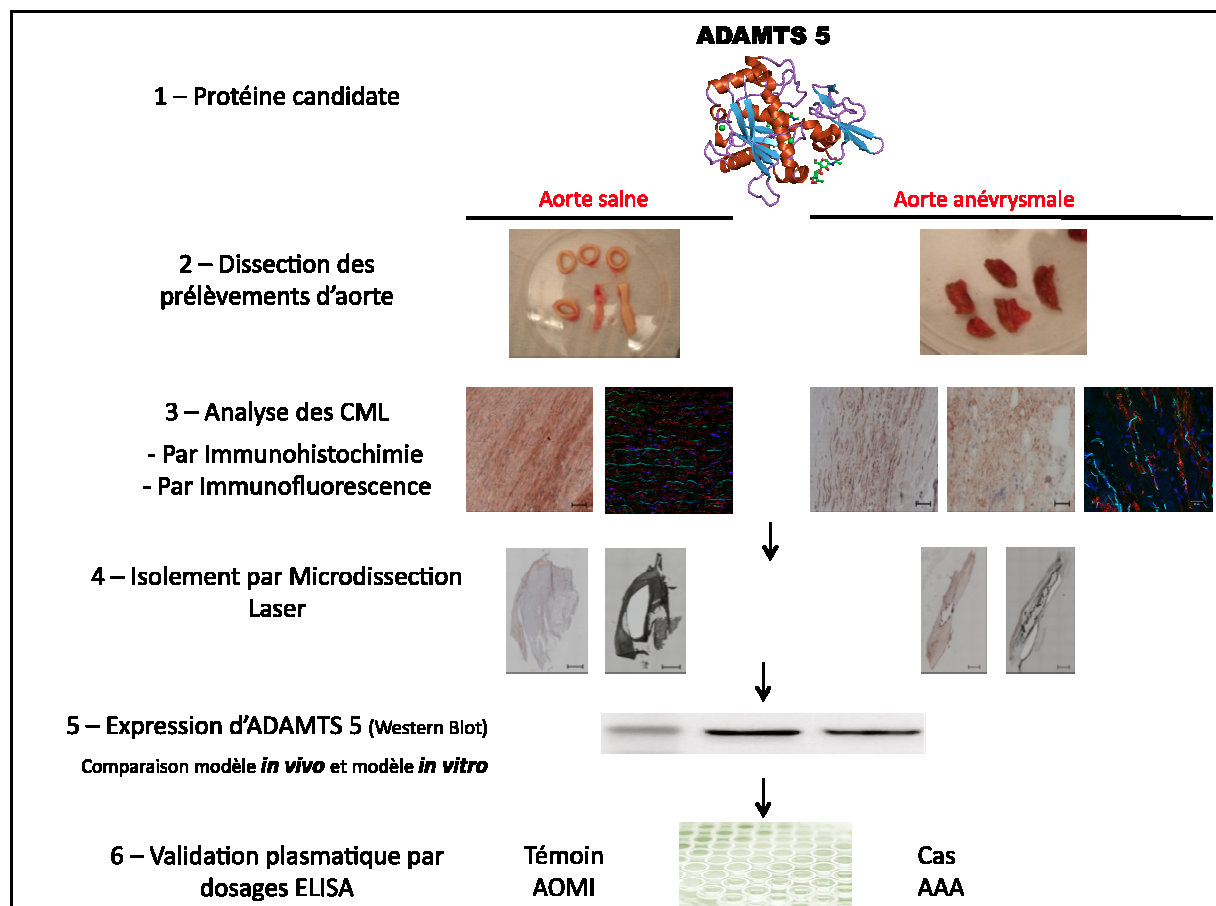


Figure 8 - Stratégie expérimentale de l'étude d'ADAMTS 5, protéine candidate, marqueur potentiel de l'AAA.

II.1.1.2 Peroxiredoxine 1 et les deux sous-types de macrophages

De façon similaire, la peroxiredoxine 1 (PRDX-1), enzyme antioxydante, a été retrouvée surexprimée dans les macrophages dérivés de monocytes des patients présentant un AAA comparés à la population contrôle de l'étude LILAS (Lamblin et al, 2011). La PRDX-1 est également retrouvée surexprimée dans la partie luminale du TIL comparée à sa partie abluminale par l'étude des milieux conditionnés d'aorte anévrysmale (Martinez-Pinna et al, 2011). La PRDX-1 participe au stress oxydatif qui est impliqué dans la formation de l'AAA par l'action des Espèces Réactives de l'Oxygène (ROS) et dans l'inflammation (McCormick et al, 2007).

Deux types de macrophages M1 pro-inflammatoires et M2 anti-inflammatoires ont été décrits dans l'athérosclérose (Chinetti- Gbaguidi et al, 2011). Dans l'AAA, les macrophages

de type M2 ont été retrouvés au site de rupture de l'AAA dans les modèles murins (Rateri et al, 2012).

II.1.2 Validation de l'approche par microdissection laser

L'approche par LMD a donc été validée par l'étude de la PRDX-1 dans les macrophages M1 et M2 (Boytard et al, 2013). Au cours de cette étude, les macrophages M1 et M2 ont été localisés dans la paroi puis isolés par LMD afin d'établir le niveau d'expression de la PRDX-1 afin de déterminer l'origine cellulaire de la PRDX-1 plasmatique des patients AAA. Cette étude a permis de valider la technique de LMD pour l'étude des cellules isolées de l'AAA.

II.1.3 Criblage des miARNs dans les cellules isolées impliquées dans l'AAA

Les cellules vasculaires impliquées dans l'AAA sont les cellules inflammatoires d'une part telles que les macrophages M1 pro-inflammatoire et M2 anti-inflammatoire, les neutrophiles, les lymphocytes de type B et T et les mastocytes, et les cellules musculaires lisses d'autre part ont donc été localisées dans le tissu anévrysmal. Une analyse histologique a été menée pour caractériser la distribution de ces cellules dans la paroi de l'AAA. Cette distribution a été comparée à celle de la paroi aortique non anévrysmale. Comme Sho et al (2005), les cellules vasculaires identifiées et localisées sont isolées par microdissection laser afin d'étudier leur profil transcriptomique. Ainsi, par un criblage des miARNs sur puce à miARNs, l'expression des miARNs dans chacune des cellules vasculaires isolées a été analysé et comparé aux CML de l'aorte saine, seul type cellulaire commun entre la paroi aortique anévrysmale et non anévrysmale. Le profil d'expression des cellules vasculaires permettra d'identifier des miARNs, marqueurs potentiels de l'AAA. L'identification des cibles des miARNs sélectionnés permettra d'identifier les voies de signalisation impliquées dans l'AAA et donc les marqueurs potentiels. La stratégie expérimentale est résumée sur la Figure 9.

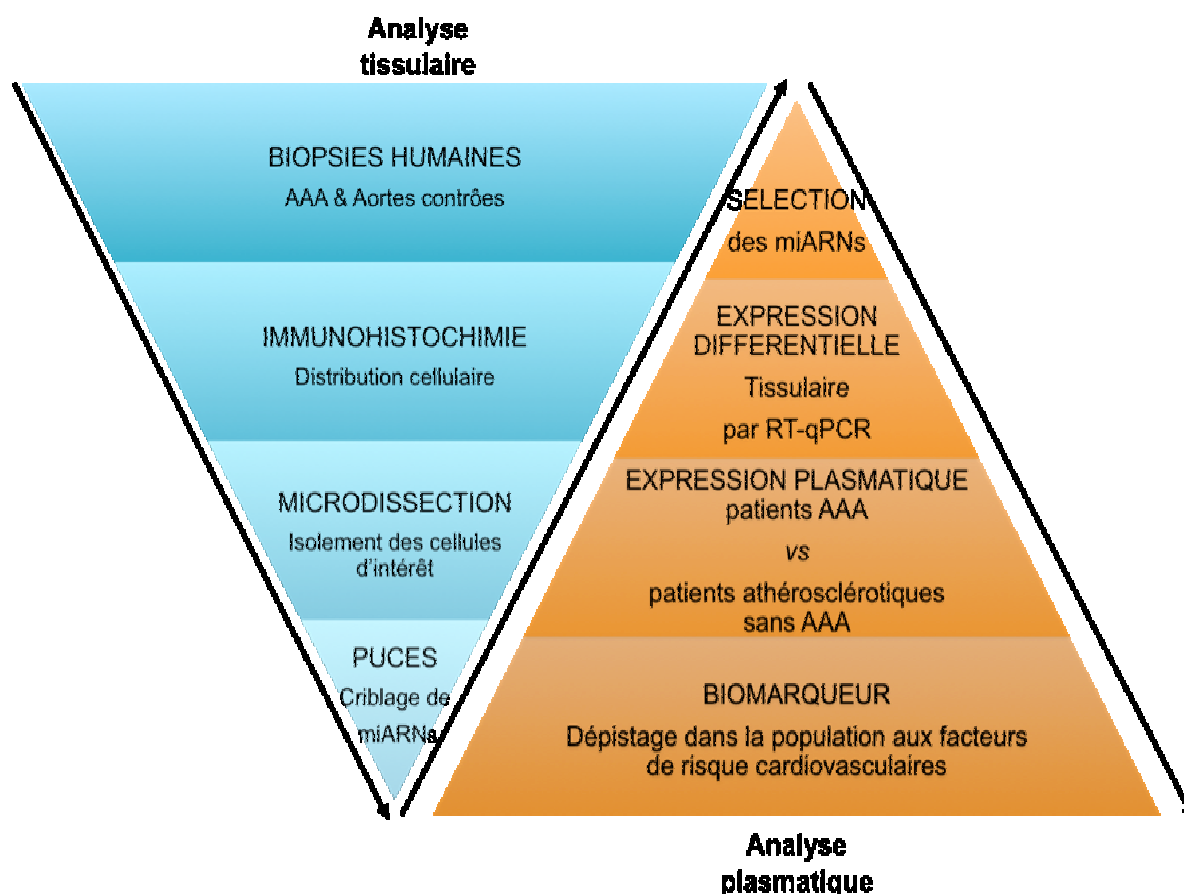


Figure 9 - Stratégie expérimentale du criblage des miARNs à partir des cellules vasculaires isolées par LMD, du tissu vers la validation plasmatique des miARNs comme biomarqueurs potentiels.

II.2 Recherche de biomarqueurs plasmatiques de l'AAA

ADAMTS 5 et les miARNs sélectionnés par criblage des cellules vasculaires isolées du tissu anévrysmal seront testés comme biomarqueurs potentiels dans le plasma des patients présentant un AAA. La biobanque de plasma constituée dans le laboratoire dans le cadre de l'étude LILAS permet de comparer l'expression de ces biomarqueurs chez 24 patients avec un AAA et 18 patients sans AAA. La mise en évidence de biomarqueurs de l'AAA remplirait plusieurs objectifs. D'une part un objectif diagnostique et de dépistage qui permettrait de réaliser un prélèvement sanguin pour sélectionner les patients à risque d'avoir un AAA et qui nécessiterait la réalisation d'une imagerie de confirmation par une échographie, un angioscanner ou une ARM. D'autre part, un objectif de suivi des patients traités par voie

endovasculaire, avec la mise en évidence d'une corrélation d'un biomarqueur avec la régression du processus anévrysmal autrement que par la réalisation d'imagerie irradiante telle que l'angioscanner. Enfin, un objectif pronostique par la corrélation d'un biomarqueur avec l'évolutivité et le diamètre de l'AAA.

TRAVAUX PRELIMINAIRES

III TRAVAUX PRÉLIMINAIRES

III.1 Échantillons

III.1.1 Banque de biopsies AAA et non AAA

Afin d'étudier la physiopathologie de l'AAA, nous avons choisi l'étude du tissu humain. Pour cela, une banque de tissu a été constituée au laboratoire grâce à la collaboration du Service de Chirurgie Vasculaire (Hôpital Cardiologique, CHRU de Lille) pour le prélèvement de tissu anévrysmal.

Un total de 32 échantillons a été collecté en accord avec la Déclaration d'Helsinki. Un consentement éclairé a été obtenu pour chaque prélèvement tissulaire. Les dix premiers échantillons ont été immédiatement congelés puis les 22 suivants ont été conservés dans du sérum physiologique à 4°C. Les prélèvements étaient obtenus par découpe de la paroi anévrysmale au cours de chirurgie d'AAA par laparotomie permettant d'obtenir un échantillon de la paroi et du TIL. Les échantillons congelés étaient découpés avant congélation et conservés dans l'azote liquide. Les échantillons étaient conservés moins de douze heures dans le sérum physiologique mais toujours à 4°C et acheminés au laboratoire pour analyse macroscopique. La conservation dans le sérum physiologique permet en effet de conserver la morphologie des biopsies. L'orientation de chaque biopsie consistait en un repérage de la partie luminale et de la partie adventitielle de la paroi de l'AAA. Puis les morceaux orientés étaient découpés en carré de 5 mm de côté approximativement. Au moins deux morceaux par biopsie étaient traités pour inclusion en paraffine après déshydratation et maintien de l'orientation du tissu, pour étudier la structure *ad integrum* de la paroi de l'AAA. Les autres morceaux étaient maintenus en congélation dans l'azote liquide. Aucune donnée clinique n'a été obtenue chez les patients dont le tissu a été prélevé.

L'obtention des biopsies d'aortes non anévrysmales est réalisée en collaboration avec le service de Chirurgie Digestive et de Transplantation et de l'équipe de coordination des prélèvements multiorganes (PMO) du CHRU de Lille dans le cadre du protocole PFS 11-004 en accord avec l'Agence de Biomédecine. Le consentement de la famille était systématiquement recueilli. Le tissu contrôle obtenu est un tissu aortique humain issu de l'aorte abdominale sous-rénale. Ainsi, la localisation anatomique est similaire à celle des AAA prélevés. Un total de 14 échantillons a été obtenu au cours de PMO. Les patients étaient exclus en cas d'AAA au TDM réalisé systématiquement ou d'athérosclérose sévère (calcifications circonférentielles, sténose aortique > 50% de la lumière aortique). Ces prélèvements sont traités de façon similaire à celle des AAA maintenus initialement dans le sérum physiologique puis découpés au laboratoire après orientation du tissu afin de disposer d'échantillons inclus en paraffine et d'échantillons congelés.

III.1.2 Banque de plasmas LILAS

Au laboratoire, une banque de plasma a été constituée dans le cadre de l'étude LILAS (Lamblin et al, 2010). Au total, 24 prélèvements de plasma chez des patients présentant un AAA et 18 prélèvements de plasma de patients présentant une localisation athérosclérotique aux membres inférieurs ou aortique mais sans AAA constituent cette banque de prélèvements. Une quantité de 80 mL de sang était prélevée pour chaque patient inclus avant la chirurgie. Les patients AAA étaient éligibles pour une chirurgie pour un diamètre aortique supérieur à 50 mm de diamètre ou une évolution rapide (>10 mm par an). Le consentement éclairé des patients était obtenu en accord avec les Déclarations d'Helsinki et avec le Comité éthique du CHRU de Lille (CP03/47 du 2 juin 2003). Les patients inclus dans l'étude LILAS sont âgés de plus de 55 ans et ont tous bénéficié d'une imagerie de l'aorte permettant de confirmer la présence ou l'absence d'AAA. Les AAA infectieux, traumatiques ou associés aux maladies du tissu conjonctif et les antécédents de traitement chirurgical d'AAA constituaient les critères

d'exclusion. La population contrôle (PAD) est donc une population présentant les mêmes facteurs de risque et un traitement similaire à celui des patients avec un AAA (Thompson et al, 2002). Les informations cliniques sont résumées dans la table 7.

Table 7 - Caractéristiques cliniques de la population LILAS

Caractéristiques cliniques	Patients AAA (n=24)	Patients PAD (n=18)	P
Âge, années	68 ± 6,1	62,3 ± 6,6	0,006
Sexe masculin, %	24 (100)	18(100)	-
<i>Données anthropométriques</i>			
Poids, kg	82,9 ± 11,6	78,7 ± 15,1	0,32
Taille, cm	173,8 ± 5,4	172,6 ± 7,1	0,54
Indice de masse corporelle, kg/m ²	27,4 ± 3,7	26,3 ± 4,1	0,35
Diamètre aortique (mm)		56,1 ± 2,3	
<i>Facteurs de risque cardiovasculaires, n (%)</i>			
Intoxication tabagique actuelle	4 (17)	4 (22)	0,71
Tabagisme sévéré	17 (71)	13 (72)	1,0
Hypercholestérolémie	14 (58)	12 (67)	0,75
Hypertension artérielle	15 (63)	10 (56)	0,75
Diabète (types 1 et 2)	4 (17)	5 (28)	0,46
Antécédent familial de coronaropathie	4 (17)	2 (13)	1,0
Antécédent personnel de coronaropathie			
- Angor stable	2 (8)	2 (11)	1,0
- Infarctus du myocarde	7 (29)	6 (35)	0,74
- Pontage coronarien	1 (4)	6 (33)	0,03
- Angioplastie coronarienne	4 (17)	2 (13)	1,0
Antécédent d'accident vasculaire cérébral	0	2 (12)	0,17

III.2 Distribution des cellules impliquées dans l'AAA

La première étape de l'analyse tissulaire est de localiser les cellules impliquées dans l'AAA et d'analyser la distribution des cellules au sein de la paroi aortique. Pour cela les échantillons d'aorte anévrysmale et saine sont orientés et découpés en coupes transversales (Figure 10).

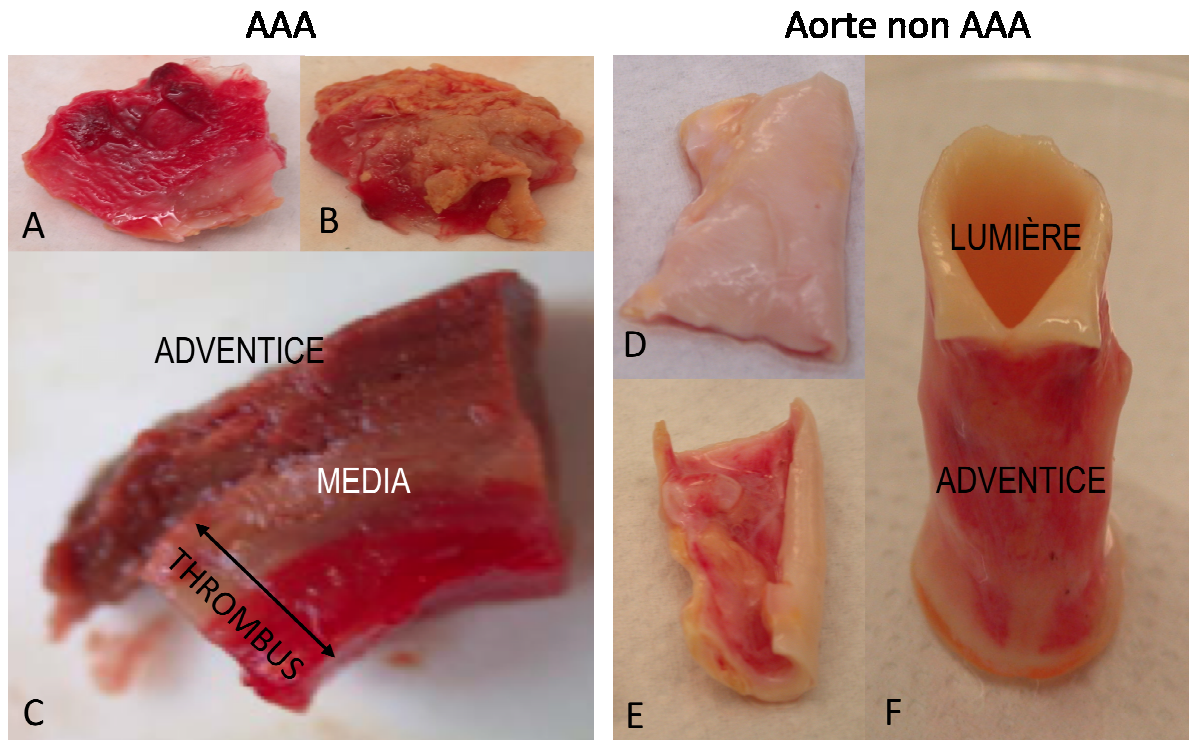


Figure 10 - Analyse macroscopique des échantillons d'AAA (A, B, C) et d'aorte contrôle (D, E, F) avec orientation après repérage de la lumière et de l'adventice (C, F). Les échantillons sont découpés transversalement avec maintien du repère de l'intima (A, D) et de l'adventice (B, E).

L'analyse des tissus en paraffine a permis de maintenir l'architecture de la paroi anévrysmale pour évaluer la distribution des cellules de l'AAA. Les 20 échantillons d'AAA conservés en paraffine ont été analysés. Tout d'abord, l'analyse histologique repose sur les colorations en May-Grunwald-Giemsa nous permettant de repérer de nombreuses cellules résidentes dans la paroi de l'AAA et de différencier les différentes tuniques de la paroi AAA (Figure 11A-C). Les cristaux de cholestérol retrouvés dans l'athérosclérose ont également été observés dans les échantillons d'AAA (Chen et al, 2010). Les lipides ont été identifiés par la coloration *Oil Red O* et les dépôts de fer repérés par la coloration Perls-Van Gieson (Figure 11D, E).

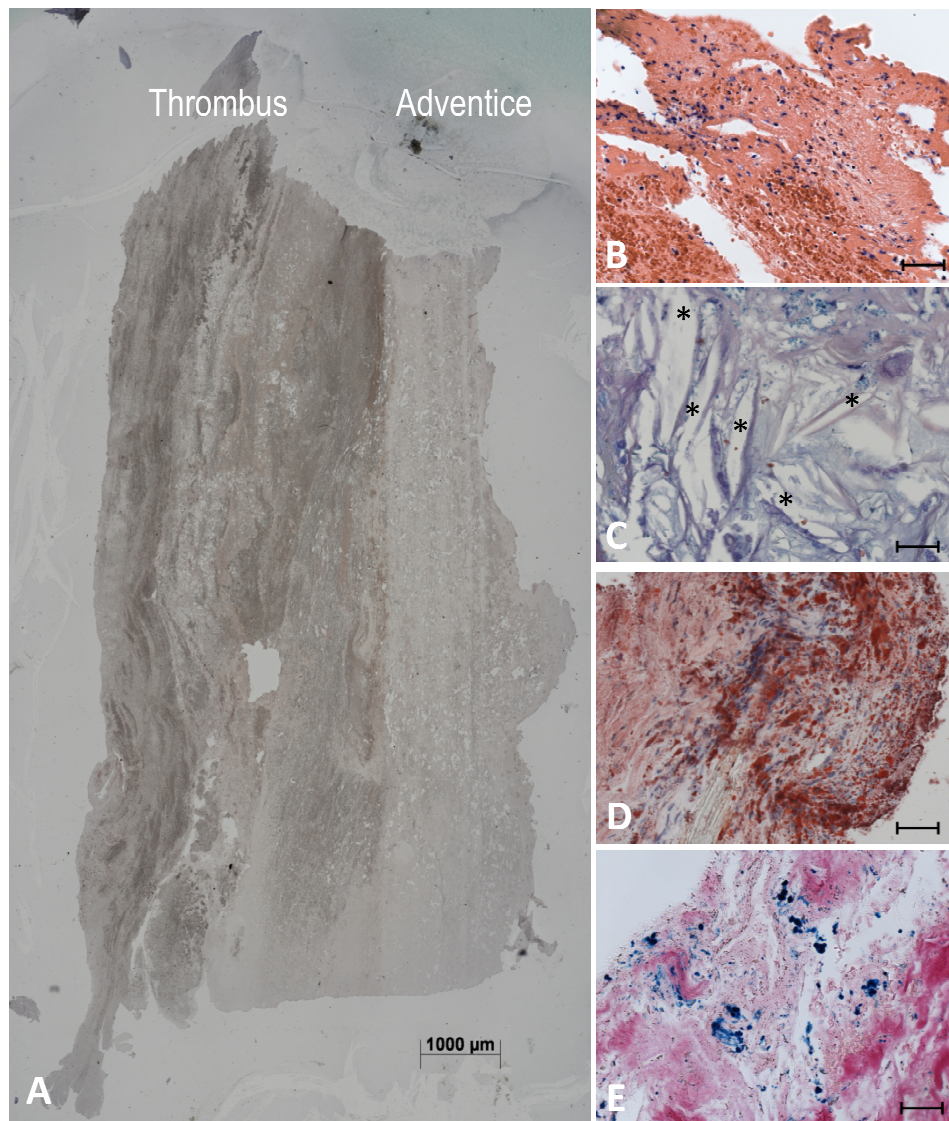


Figure 11 - Analyse histologique de la paroi anévrysmale. Les coupes transversales colorés par May-Grunwald -Giemsa (A-C) différencie les différentes tuniques du TIL (à gauche) vers l'adventice (à droite) à faible grossissement (A). Au grossissement supérieur, les cellules résidentes sont nombreuses (B) et les cristaux de cholestérol indiqués par une * (C). Les lipides sont détectés par la coloration Oil red O (D) et les dépôts de fer par la coloration Perls-Van Gieson (E). Échelle de 50 µm sauf A, 1000 µm.

Par la suite, l'immunomarquage a été utilisé pour identifier les cellules au sein de l'AAA. Les CML ont été repérées avec l'anticorps anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) qui détecte l'antigène correspondant exprimé par les CML. Les CML ont été localisées dans la media de l'AAA (Figure 12 A, B), au pourtour d'agréats de cellules inflammatoires (Figure 12C) et au niveau des vaisseaux adventitiels (Figure 12D). Ces vaisseaux adventitiels peuvent

correspondre à la néovascularisation décrite dans l'AAA comme un facteur de risque de rupture (Choke et al, 2006).

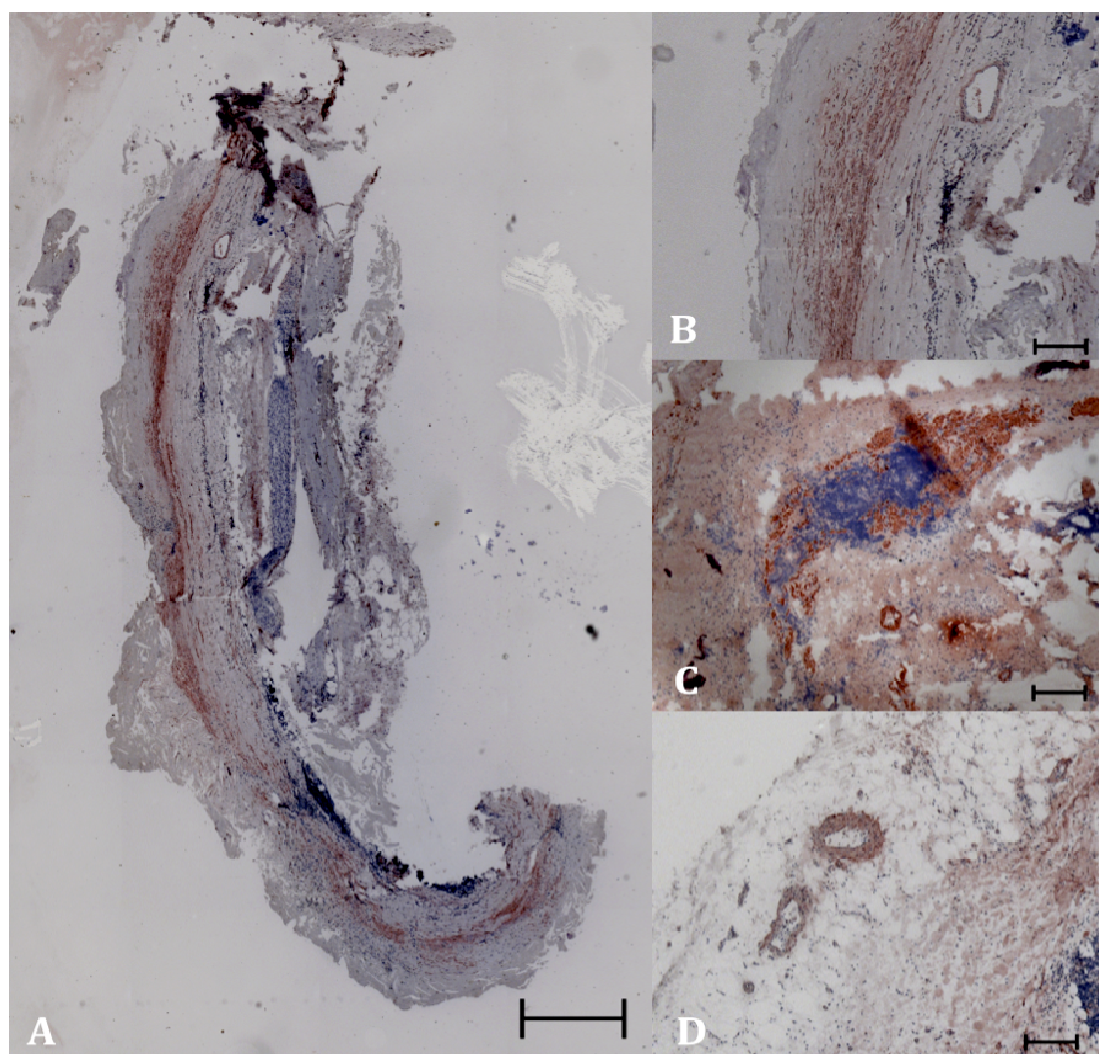


Figure 12 - Localisation des CML dans l'AAA en immunohistochimie par anti- α -SMA: A, B- dans la media de l'AAA, C- autour des agrégats de cellules inflammatoires, D- vaisseaux adventitielles. échelle à 1000 μ m (A) et 200 μ m (B, C, D)

Les différents types de cellules inflammatoires ont été localisés. Les macrophages ont été repérés par l'anti CD68, marqueur de phagocytose, et différenciés en macrophages M1 et M2 avec l'anticorps anti CD206, exprimé uniquement par les macrophages M2. Leur distribution est spécifique. En effet, les macrophages M1 pro-inflammatoires (CD68+CD206-) sont de façon préférentielle retrouvés dans l'adventice alors que les macrophages M2 anti-inflammatoires (CD68+CD206+) sont localisés dans le TIL. Les mastocytes ont été localisés

essentiellement dans l'adventice. Les neutrophiles ont été observés dans les deux localisations luminale et adventitielle comme précédemment décrit (Houard et al, 2009). Les lymphocytes T ont rarement été observés dans le TIL et les lymphocytes de type B de façon opposée sont souvent observés dans la partie adventitielle de la paroi anévrysmale. Dans sept échantillons, les lymphocytes de type B sont observés sous formes d'agrégats cellulaires formant ainsi avec les mastocytes des ATLOs (Bobryshev et al, 2001). La distribution des cellules inflammatoires pourrait offrir une compréhension des interactions entre les différentes cellules et le rôle de chacune dans l'AAA. La table 8 résume la distribution des différentes cellules dans l'ensemble des échantillons analysés.

Table 8 - Distribution des cellules inflammatoire dans l'AAA

Types cellulaires	Présence des cellules (n=20)	Anévrysme de l'aorte abdominale		
		ILT	Media	Adventitia
Neutrophiles	7	+++	-	++
Lymphocytes B	11	+	-	++ à +++
Lymphocytes T	2	+	-	-
Mastocytes	8	+	-	+++
Macrophages CD68+206-	4	-	-	+++
Macrophages CD68+206+	6	++	-	-

Quantification arbitraire de leur abondance de - (non observée), + (rares cellules), ++ (cellules nombreuses), +++ (très nombreuses cellules)

III.3 Cellules isolées par microdissection laser

Une fois repérées dans l'AAA, les cellules ont été isolées afin de mettre en évidence par l'analyse de ces cellules des marqueurs potentiels de l'AAA masqués par l'analyse du tissu global (Sho et al, 2005). La LMD permet d'isoler des zones enrichies en un type cellulaire d'intérêt. La LMD a été réalisée sur les échantillons congelés. Les échantillons à tester étaient sélectionnés à partir de la distribution et de la localisation observées des cellules dans les

échantillons en paraffine. L'analyse par coloration Oil Red O du tissu congelé permettait de définir sa cellularité avant d'identifier par immunomarquage les cellules présentes. Dans une analyse préliminaire, une mise au point a été effectuée afin d'établir un protocole pour l'extraction des protéines et des miARNs. La déshydratation des tissus nécessaire à la LMD était une étape à risque de dégradation des ARNs. Toutefois, les miARNs sont très stables dans les tissus du fait de l'absence d'interaction possible avec les RNAses circulantes qui dégradent les ARNs. Le logiciel de LMD permet de mesurer la surface microdisséquée. La surface de zones à microdisséquer a été évaluée à 4 mm² pour obtenir 100 ng d'ARN total et 10 mm² pour extraire 10 µg de protéines. Le protocole établi pour l'isolement de zones d'intérêt dans le tissu AAA pour l'extraction d'ARN total est présenté dans la figure 13. Pour l'extraction de protéines, l'agent utilisé pour l'extraction est le tampon RIPA.

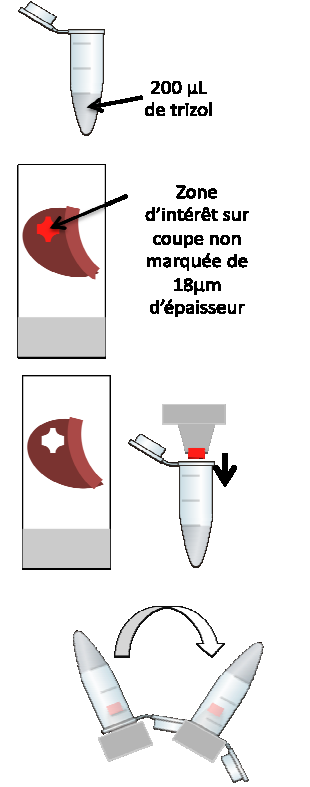
<ol style="list-style-type: none"> 1. Préparer 5 tubes de 200 µL de trizol dans des tubes Eppendorf de 0,5 mL stérilisés. Conserver 4 tubes à 4°C au réfrigérateur, et placer un tube dans la glace à conserver pour le début de la manipulation. 2. Des coupes de l'échantillon sont réalisées au cryostat (-20°C), épaisseur de coupe de 18 µm. Apposer 3 coupes sur la lame PEN Membrane. <p>Les 4 étapes suivantes doivent être réalisées en moins de 30 min :</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Sortir les lames du cryostat et assécher les coupes dans un bain d'éthanol absolu moins de 10 sec, puis dans un bain de xylène moins de 10 secondes. 4. Retirer le milieu NEG 50 asséché délicatement afin de ne pas endommager la membrane protectrice de la lame ni décoller les coupes apposées sur la lame. 5. Débuter la microdissection après repérage des zones d'intérêt sur les coupes marquées. 6. Placer la capsule utilisée sur le tube Eppendorf conservé dans la glace. 7. Agiter 10 min tête en bas, à 4°C, puis centrifuger 30 secondes à 10000 rpm. 8. Conserver le tube à -80°C. 9. Récupérer un nouveau tube contenant 200 µL de trizol et répéter les étapes 2 à 8 jusqu'à l'obtention d'une surface de 10 mm² découpée. 	 <p>200 µL de trizol</p> <p>Zone d'intérêt sur coupe non marquée de 18µm d'épaisseur</p>
---	---

Figure 13 - Protocole de LMD pour l'extraction d'ARN total d'une zone d'intérêt isolée.

De ces travaux préliminaires, nous avons identifié une organisation cellulaire spécifique de l'AAA (Figure 14). Aucune cellule inflammatoire n'est observée dans la media qui présente une raréfaction des CML. La distribution des sous-types de macrophages dans les tuniques opposées de l'AAA fait évoquer un équilibre entre les propriétés pro-inflammatoires des macrophages M1 et les propriétés opposées anti-inflammatoires des macrophages M2. D'autre part, les ATLOs sont des structures inflammatoires organisées dont le rôle dans le rejet de transplantation et dans l'autoimmunité a été mis en évidence (Neyt et al, 2012). Leurs rôles dans l'AAA reste à définir.

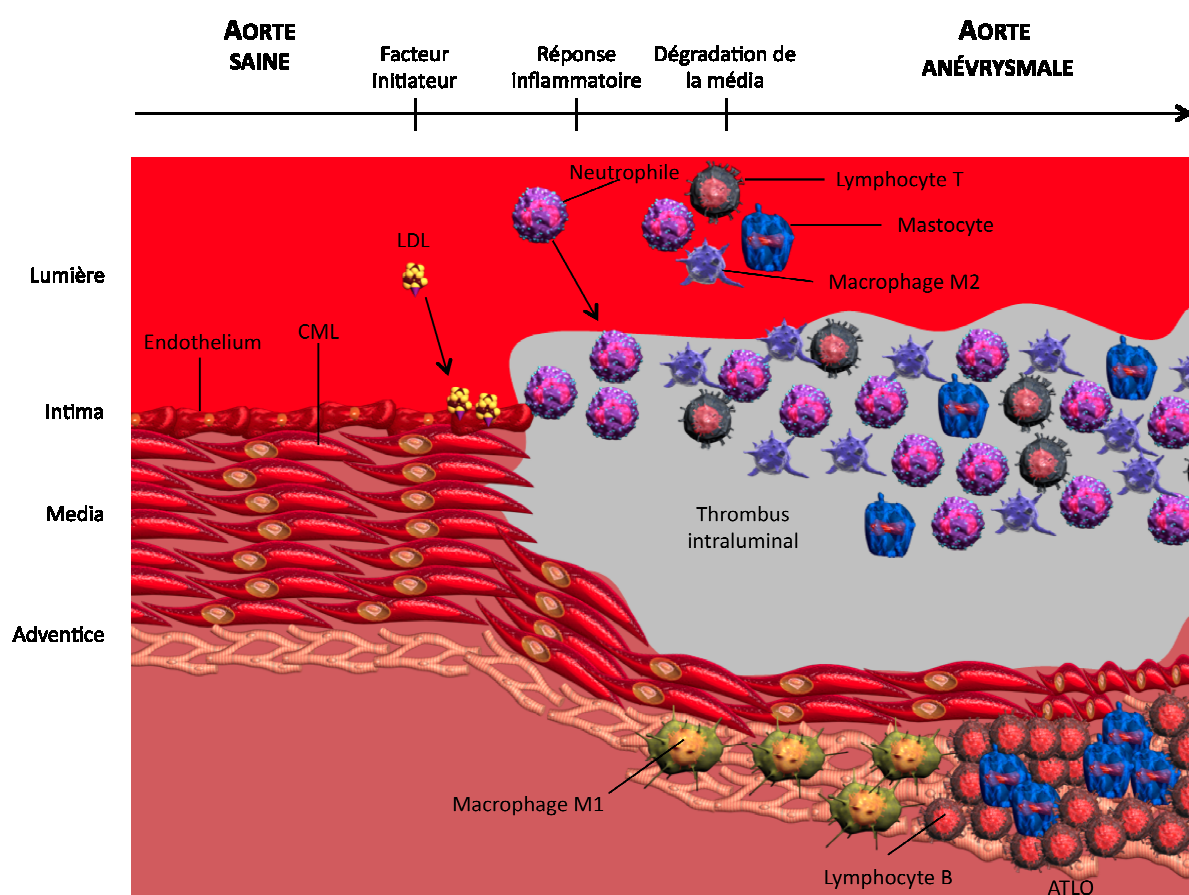


Figure 14 - Schéma du développement de l'AAA et de l'évolution de la distribution des types cellulaires au cours de la pathologie.

RESULTATS

IV RÉSULTATS

Les résultats présentent les deux approches utilisées pendant ma thèse. Tout d'abord, nous avons utilisé une approche ciblée sur un marqueur potentiel, l'ADAMTS 5, issu des données transcriptomique et de protéomique du laboratoire (Lamblin et al, 2010). Cette approche a également été utilisée pour la PRDX-1 exprimée dans les macrophages. Puis, nous avons réalisé une approche sans *a priori* de criblage des miARNs exprimés par les cellules vasculaires isolées de la paroi de l'AAA afin d'avoir une meilleure compréhension de la pathologie anévrysmale et de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de l'AAA. L'ensemble de ces approches repose sur l'étude des cellules isolées du tissu anévrysmal chez l'Homme.

Approche ciblée : les biomarqueurs potentiels de l'AAA

IV.1 ADAMTS 5 et les CML anévrysmales

IV.1.1 Contexte

Au cours de l'étude de l'analyse transcriptomique des cellules vasculaires en culture et du plasma issus des patients présentant un AAA, ADAMTS 5 a été retrouvée surexprimée dans l'AAA comparé à la population contrôle de patients athérosclérotiques (Lamblin et al, 2010). L'utilisation de puces à protéines a permis de confirmer la modulation d'ADAMTS 5 dans les macrophages et les CML. ADAMTS 5 est une enzyme ayant pour substrat les protéines de structures de la MEC tel que le versican (Hattori et al, 2011). Cette protéine est retrouvée exprimée par les CML vasculaires à l'état physiologique (McCulloch et al, 2009). Plus spécifiquement, ADAMTS 5 est impliquée dans le processus athérosclérotique par son activité protéolytique sur les protéoglycanes. Les protéoglycanes de la MEC et en particulier le biglycan ont la capacité de se lier aux LDLs dans l'aorte (Didangelos et al, 2012).

Les CML sont impliquées dans le processus d'athérosclérose (Doran et al, 2008). Plus précisément dans l'AAA, les CML se raréfient dans la media de l'aorte (López-Candales et al, 1997). Cette raréfaction est liée à la mise en apoptose des CML au sein de l'AAA par un processus apoptotique spécifique, qui est secondaire au détachement des cellules de la MEC (Michel JB, 2003). Diverses populations de SMC aux rôles distincts ont été évoquées dans l'athérosclérose (Hao et al, 2003). L'étude histologique des échantillons d'AAA a donc été menée afin de caractériser les CML de l'AAA.

La paroi anévrysmale contient des cellules inflammatoires et des CML (Michel et al, 2011). Les CML anévrysmales sont comparées aux CML issues de la paroi aortique saine, dont elles sont les cellules résidentes. Ainsi, les différents types de CML identifiées ont été isolés par LMD afin de comparer les niveaux d'expression de différents marqueurs des CML et d'ADAMTS 5.

IV.1.2 Les deux morphotypes de CML dans l'AAA

IV.1.2.1 Immunohistochimie

Afin d'identifier les CML, nous avons choisi d'analyser par immunohistochimie l'expression de deux marqueurs, α -SMA et la desmine, dans les parois anévrysmales et non anévrysmales (Figure 15). De plus, les CML peuvent être soumises à de nombreuses modifications phénotypiques entre autres les phénotypes contractile et sécrétoire (Chamley-Campbell et al, 1981). L'anticorps α -SMA identifie les filaments d'actine participant à l'appareil contractile de la CML (Patel et al, 1996). La desmine constitue le cytosquelette de la CML, participe à la stabilité du sarcomère, et permet de confirmer le phénotype de CML en association avec l'anti- α -SMA (Speer et al, 2005).

Afin de mettre en évidence la présence d'apoptose des CML dans la paroi anévrysmale nous avons utilisé un anticorps dirigé contre la caspase 3 active, protéine exprimée par les cellules en apoptose et activée dans les deux voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

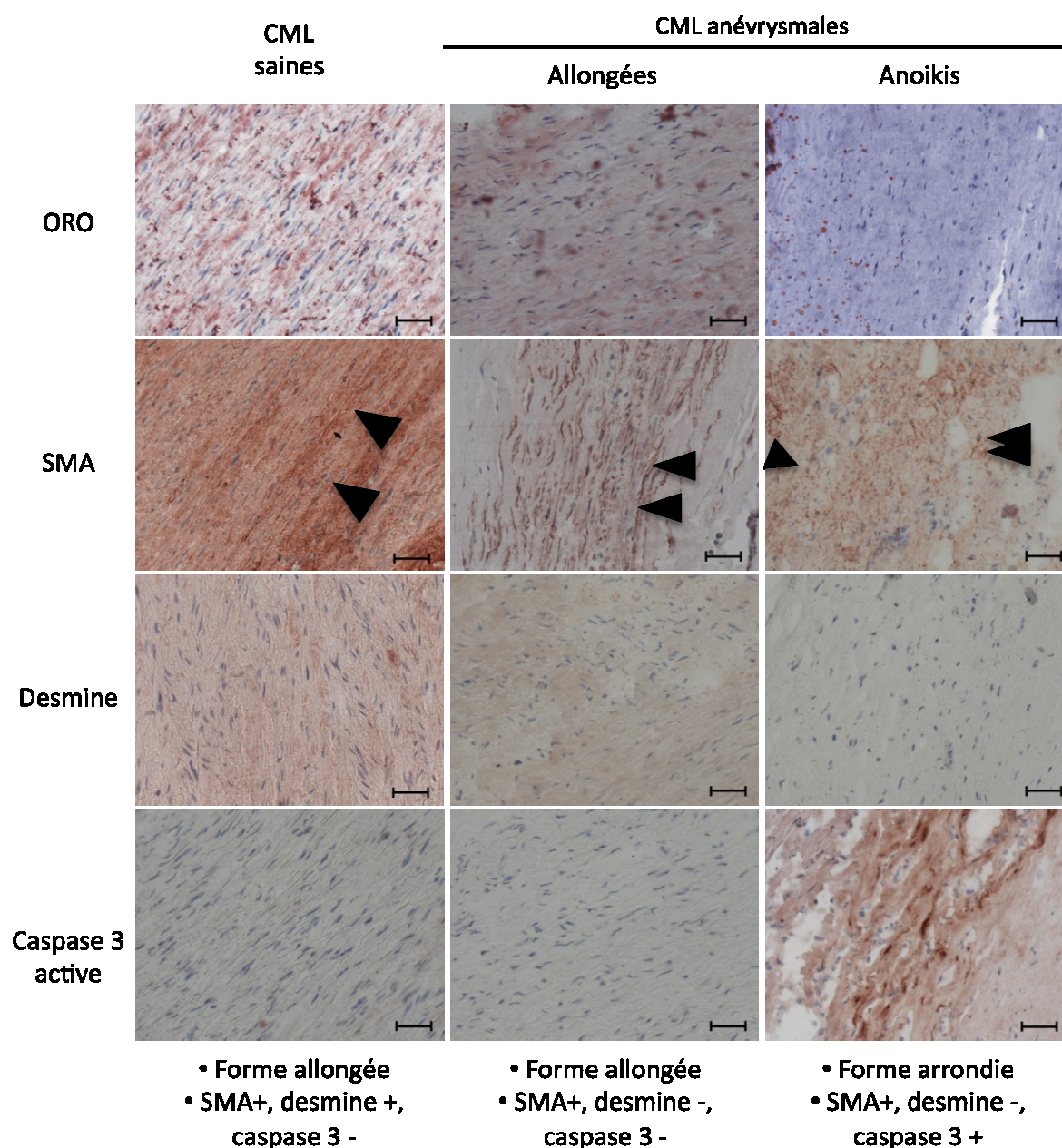


Figure 15 - Analyse histologique des deux morphotypes de CML anévrysmales et du morphotype de CML de la paroi aortique saine

La figure 15 présente la caractérisation des CML présentes dans les parois anévrysmales et non anévrysmales. La coloration Hématoxyline utilisée dans la coloration Oil Red O (ORO), nous permet d'analyser la densité cellulaire du tissu étudié en colorant les noyaux. Deux

formes de noyaux sont observées par la coloration hématoxyline, les noyaux de forme allongée et les noyaux de forme arrondie. On observe dans l'aorte anévrysmale une raréfaction des cellules au sein de la media comparée à la paroi aortique saine. Le marquage anti- α -SMA et anti-desmine permet de confirmer que les cellules observées sont des CML.

Dans la paroi aortique saine, les CML de forme allongée expriment avec la même intensité l' α -SMA et la desmine. Par contre, il n'y a pas de marquage de caspase 3 active. Nous observons donc dans la paroi non anévrysmale des CML de forme allongée (SMA+desmine+caspase 3-).

Le marquage anti- α -SMA reste d'intensité comparable dans les deux parois. Deux morphotypes sont présents dans la paroi anévrysmale: un morphotype allongé similaire à celui des CML saines et un morphotype arrondi. Nous observons un marquage moins intense de la desmine dans la media des parois anévrysmes à la fois au niveau des CML de forme allongée et des CML de forme arrondie. Le marqueur de l'apoptose, la caspase 3 active, est retrouvé spécifiquement dans les CML de forme arrondie de la paroi anévrysmale. Au total dans la paroi anévrysmale, deux morphotypes sont observables: les CML de morphotype allongé positives pour α -SMA et négatives pour la desmine et la caspase 3 et les CML de morphotype arrondi négatives pour la desmine et positives pour α -SMA et caspase 3.

La table 9 résume les différents morphotypes de CML observés sur les 32 échantillons d'AAA analysés et les 3 échantillons d'aorte non anévrysmale. On observe une diminution d'un facteur 2 de l'épaisseur de la media, rapportée à l'épaisseur de la section transversale de l'échantillon, entre la paroi aortique non anévrysmale et anévrysmale sous réserve d'un nombre d'échantillon limité pour les aortes non anévrysmes.

Table 9 - Caractéristiques des CML observées dans les parois de l'aorte anévrysmale et contrôle

Paroi aortique	Morphologie nucléaire	Présence de CML*	Épaisseur Media/Section (%)	Immunomarquage		
				α -SMA	Desmine	Caspase 3
AAA	arrondie	21/32	45,5	+	+/-	+
	allongée	22/32	45,5	+	+/-	-
Non AAA	allongée	3/3	85	+	+	-

* nombre d'échantillons analysés

L'observation histologique et immunohistochimique de deux morphotypes dans la paroi anévrysmale est insuffisante pour affirmer la présence de deux types de CML distinctes dans l'AAA. Nous avons donc essayé de caractériser de façon plus approfondie les CML observées par des expériences d'immunofluorescence et de comarquage.

IV.1.2.2 Caractérisation des morphotypes observés de CML

L'immunomarquage réalisé sur une coupe d'une épaisseur de 7 μ m ne permet pas d'affirmer la présence de morphotypes distincts dans la paroi anévrysmale. Par cette technique, nous analysons en bidimensionnel en ignorant l'épaisseur du tissu. Un morphotype allongé pourrait être interprété à tort comme étant un morphotype arrondi s'il était analysé dans un plan de coupe perpendiculaire au grand axe. Ainsi, l'analyse en immunofluorescence permet de corriger ces observations et de mieux caractériser la morphologie des CML dans les parois anévrysmales et non anévrysmales grâce à la microscopie confocale (Zinchuk et al, 2007).

L'avantage de l'immunofluorescence avec une analyse de coupe de l'ordre du micron est d'évaluer la colocalisation de marqueurs d'intérêt (Zinchuk et al, 2007). Nous avons donc caractérisé chaque morphotype de CML en utilisant le comarquage α -SMA et caspase 3 active et évaluer la morphologie nucléaire en coupes étagées (Figure 16).

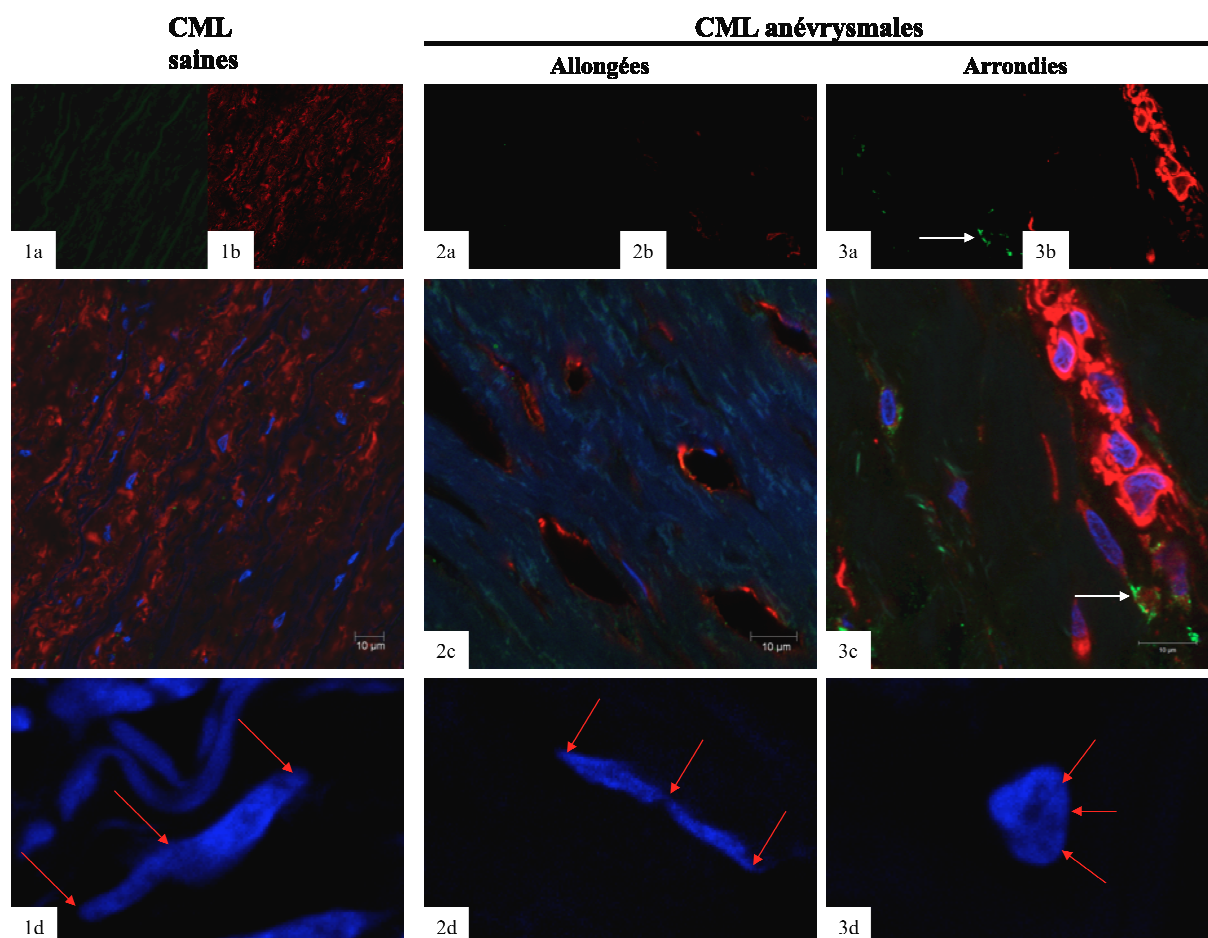


Figure 16 - Caractérisation en immunofluorescence des morphotypes de CML saines (1) et des CML anévrysmales allongées (2) et arrondies (3). (a): marquage de la caspase 3 (VERT) indiquée par la flèche blanche en 3a et 3c, (b): marquage de l' α -SMA (ROUGE), (c): comarquages Hoechst- α -SMA-caspase 3 active, (d): morphologie du noyau en Hoechst (BLEU) indiqué par les flèches rouges.

Nous observons en immunofluorescence une expression d' α -SMA similaire dans les 3 morphotypes de CML. La caspase 3 active est principalement retrouvée au niveau des CML anévrysmales de morphotype arrondi. Un marquage périnucléaire est en faveur d'un marquage spécifique (flèche blanche, Figure 16 (3a, 3c)). Par ailleurs, la morphologie nucléaire permet de distinguer les morphotypes allongés et arrondis. Le morphotype nucléaire allongé de l'AAA est similaire à celui que l'on retrouve dans les CML saines toutefois le noyau semble moins volumineux que celui des CML saines. Nous observons des vacuoles intra-nucléaires dans les noyaux arrondis pouvant faire évoquer des corps apoptotiques (Earnshaw et al,

2005). Ainsi, les trois types de CML peuvent être différenciées en fonction de l'expression de caspase 3 active et de leur morphologie nucléaire.

Afin d'objectiver la différence nucléaire des différents morphotypes de CML, nous avons aussi mesuré le volume nucléaire. Nous avons réalisé une estimation du volume des noyaux évalués à partir d'une coupe de 10 μm grâce à la coloration au Hoechst avec le logiciel ImageJ (Table 10). Seuls étaient utilisés pour la mesure les noyaux visibles en entier sur la coupe de tissu étudiée et des cellules marquées par α -SMA.

Table 10 - Estimation du volume nucléaire dans les morphotypes de CML

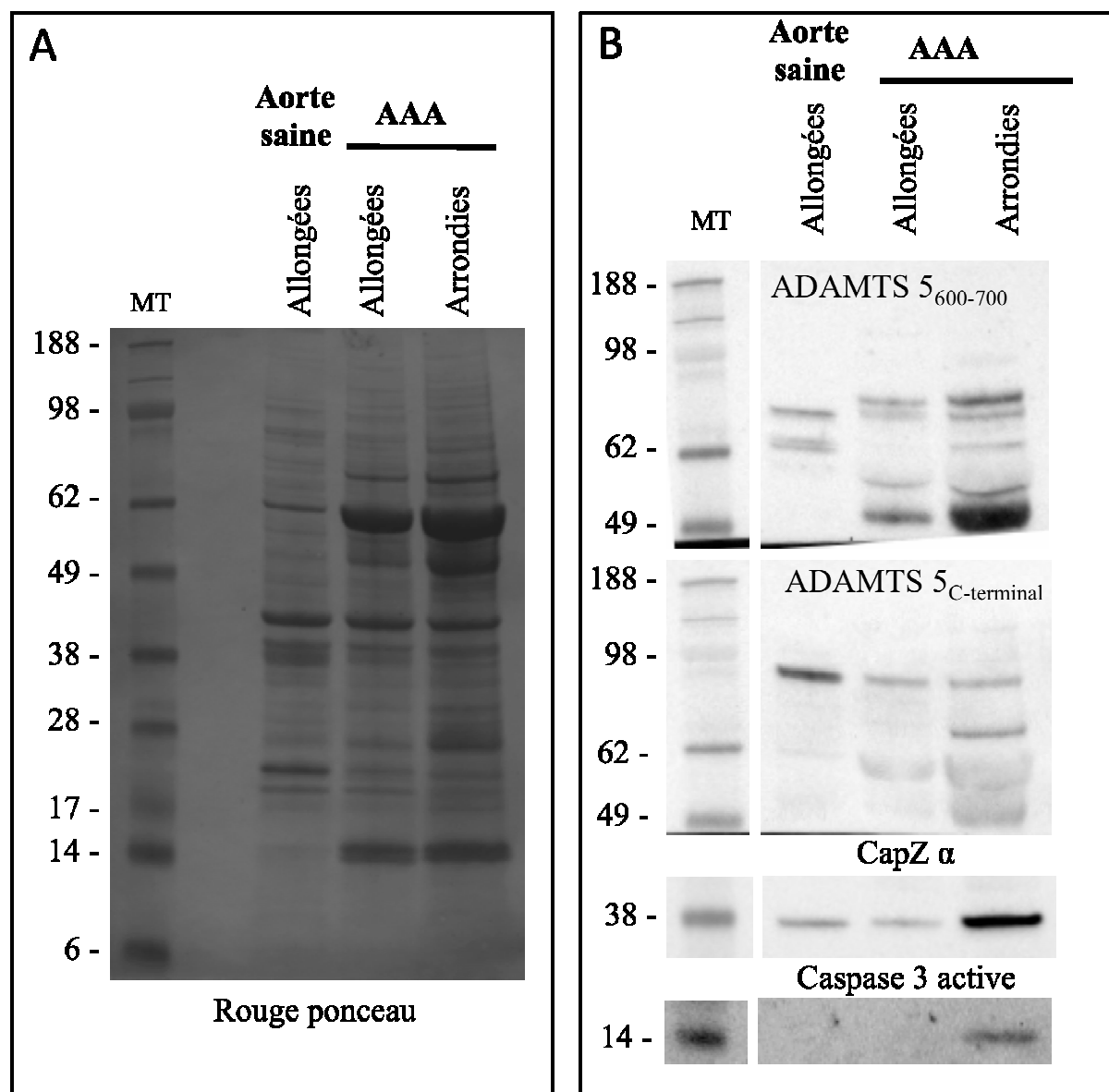
Tissu analysé	Morphotype de CML	Nombre de noyaux	Volume nucléaire (μm^3) moyenne [IC _{95%}]
AAA	Allongé	16	536 [403-669]
	Arrondi	13	318 [216-420]
Non AAA	Allongé	10	1545 [1275-1815]

Il existe une diminution du volume nucléaire des CML du tissu sain vers l'AAA et au sein de l'AAA, du morphotype allongé vers le morphotype arrondi. D'un point de vue morphologique, nous confirmons la distinction de deux morphotypes dans la paroi anévrysmale dont la morphologie de type arrondie et allongée est similaire à celle observée dans l'athérosclérose (Speer et al, 2005). Les CML anévrysmes se différencient également par l'expression du marqueur apoptotique, la caspase 3 active. Pour valider l'expression spécifique de la caspase 3 active dans les CML arrondies de l'AAA, les deux morphotypes de CML ont été isolés par LMD pour quantifier l'expression de caspase 3 par Western Blot.

IV.2 Profil d'expression d'ADAMTS 5 dans les CML

Les CML sont repérées en immunomarquage par l' α -SMA dans les parois aortiques d'AAA et de contrôle. Une fois localisés, l'expression de la caspase 3 active et l'analyse

morphologique différencient les deux morphotypes de l'AAA. Cinquante mm² des 3 morphotypes de CML ont été isolés afin d'obtenir 40 µg de protéines.



MT = marqueur de taille
 ADAMTS 5₆₀₀₋₇₀₀ = anticorps dirigé contre les résidus 600 et 700
 ADAMTS 5_{C-terminal} = anticorps dirigé contre la séquence C-terminale de la protéine

Figure 17 - Analyse de l'expression d'ADAMTS 5 dans les 3 morphotypes de CML (40 µg) par Western Blot. A: Rouge ponceau. B: Expression de l'ADAMTS 5₆₀₀₋₇₀₀, ADMATS 5_{C-terminal}, CapZ α, Caspase 3 active.

La quantité relative de protéines analysées en Western Blot est évaluée en Rouge ponceau (Figure 17A). L'expression de CapZ α, protéine chaperonne de l'actine exprimée dans les CML, permet de confirmer que les zones cellulaires isolées sont des CML. La caspase 3

active est uniquement retrouvée exprimée dans les CML arrondies de l'AAA (Figure 17B). L'expression d'ADAMTS 5 a été retrouvée dans les trois morphotypes de CML étudiés. Différentes bandes sont observées par Western Blot. Ces bandes de différents poids moléculaires peuvent correspondre à des sous-unités ou des produits du clivage d'ADAMTS 5. La figure 18 résume les enzymes ayant une action de clivage et leurs sites d'action sur ADAMTS 5 ainsi que les régions reconnues par les deux anticorps utilisés.

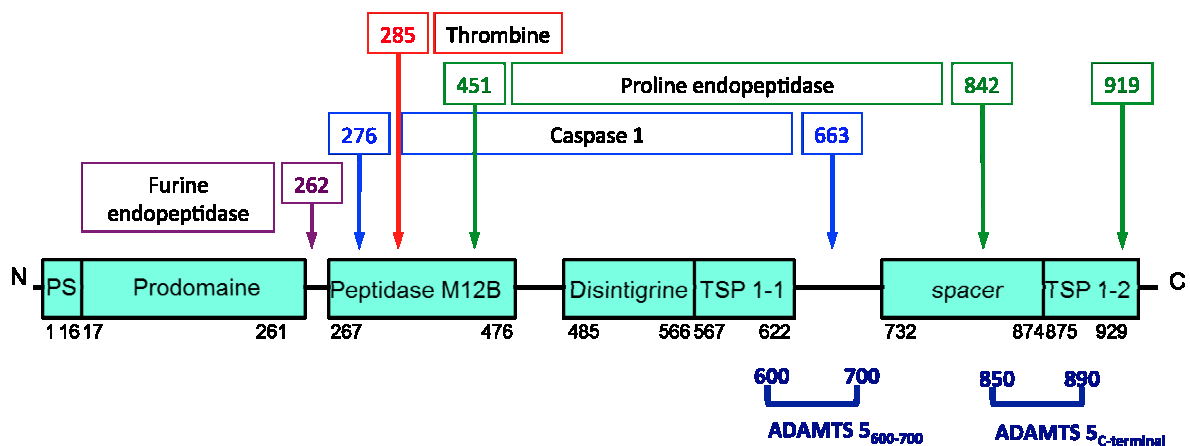


Figure 18 - Enzymes clivant ADAMTS et régions reconnues par les anticorps utilisés.

Lorsque l'anticorps testé est dirigé contre les résidus 600 à 700 d'ADAMTS 5 (ADAMTS 5₆₀₀₋₇₀₀), on observe uniquement deux bandes de 68 et 62 kilodaltons (kDa) dans les CML saines. Dans l'AAA, les deux bandes sont retrouvées dans les CML arrondies. Seule la bande à 68 kDa est observée dans les trois morphotypes de CML. Trois bandes à 69, 52 et 49 kDa sont spécifiquement observées dans les CML anévrysmales. Le second anticorps anti-ADAMTS 5 utilisé, l'anticorps anti-ADAMTS 5_{C-terminal}, est dirigé contre la séquence C-terminale d'ADAMTS 5. Une bande de 79 kDa est exprimée dans les trois morphotypes de CML mais le signal diminue dans les CML de l'AAA comparée aux CML anévrysmales. Une bande de 64 kDa est uniquement observée dans les CML arrondies.

Nous observons donc une modulation de l'expression d'ADAMTS 5 en fonction du morphotype de CML isolé. Toutefois, les bandes observées peuvent correspondre à un

manque de spécificité des anticorps qui reconnaissent des séquences communes à d'autres protéines de la famille ADAMTS. Une analyse complémentaire afin d'identifier les différentes bandes observées par Western Blot est donc nécessaire. Une hypothèse à tester est l'action d'enzymes dans l'AAA responsable de la modification de l'expression d'ADAMTS 5 avec l'expression de produits de clivage d'ADAMTS 5 reconnus par les anticorps (Figure 18). Une autre hypothèse est une variabilité des modifications post-traductionnelles d'ADAMTS 5. Le rôle d'ADAMTS 5 semble se modifier dans l'AAA et à fortiori entre le stade de CML allongée et de CML arrondie.

Nous avons analysé l'expression d'ADAMTS 5 avec l'anticorps anti-ADAMTS₆₀₀₋₇₀₀ en immunofluorescence dans les CML (Figure 19).

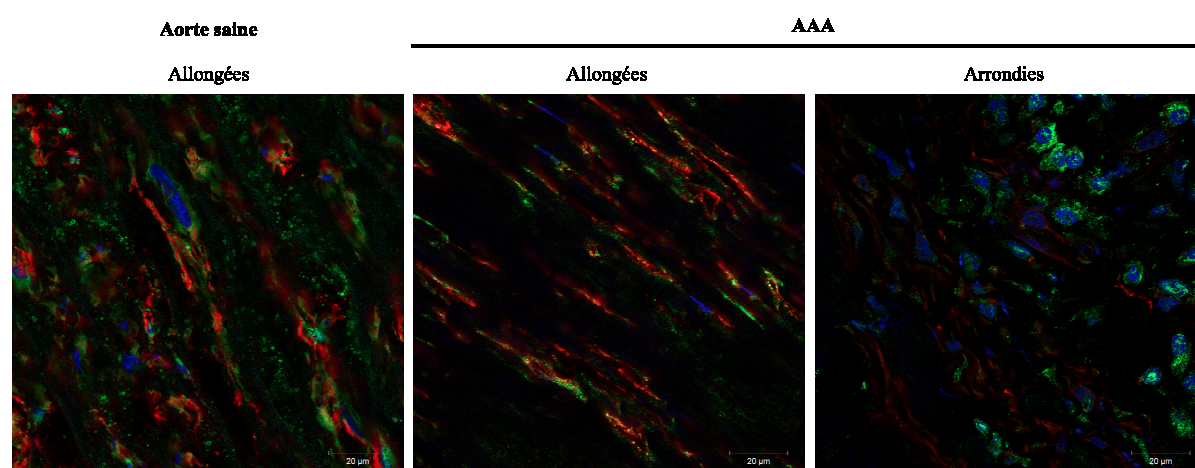


Figure 19 - Analyse en immunofluorescence de l'expression de α -SMA (ROUGE), ADAMTS 5₆₀₀₋₇₀₀ (VERT) dans les morphotypes de CML. Le noyau est marqué par Hoechst (BLEU). Échelle = 20 μ m.

Nous avons observé un marquage extracellulaire dans les trois morphotypes de CML. Le signal est granuleux au niveau des CML arrondies et diffère de celui observé dans les CML allongées de l'AAA et de l'aorte non anévrysmale. Nous avons repéré les CML par un marquage anti- α -SMA et différencié les CML anévrysmales par le marquage anti-caspase 3. Il existe une modulation de l'expression d'ADAMTS 5 dans les morphotypes observés entre la media de l'aorte saine et la media de l'aorte anévrysmale et intrinsèquement dans la paroi

anévrismale, une expression majoritairement intracellulaire d'ADAMTS 5 dans les CML allongées et à la fois intracellulaire et extracellulaire dans les CML arrondies. Le signal d'ADAMTS 5 intracellulaire est plus intense dans les CML arrondies.

Nous avons étudié l'expression des ARN messagers des marqueurs de CML (vimentine, connexine 43, CapZ α et α -SMA) et des marqueurs apoptotiques (caspases 3, 8, 9 et Bax) dans les CML allongées et arrondies de l'AAA comparées aux CML saines (Figure 20).

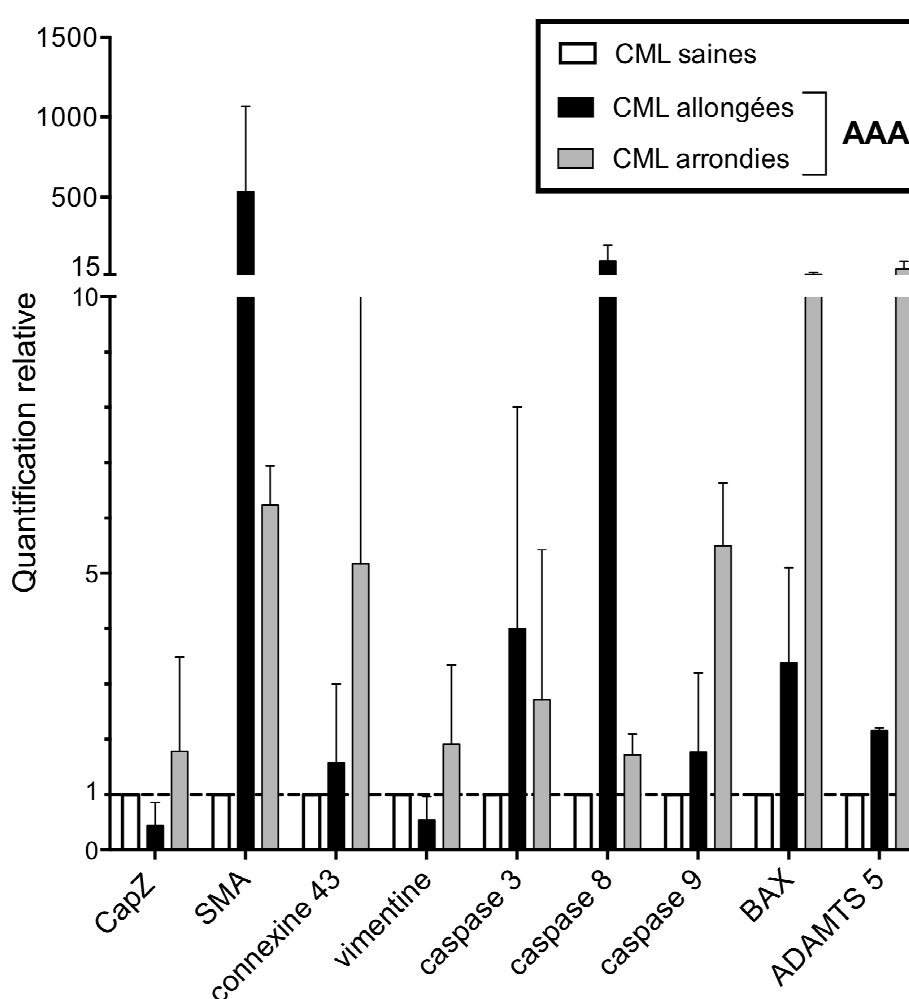


Figure 20 - Analyse transcriptomique des 3 morphotypes de CML évaluée par RT-qPCR. Quantification relative évaluée par la méthode $\Delta\Delta C_t$ comparée à l'expression dans les CML saines (gène référent PPIA).

L'analyse met en évidence la présence des marqueurs de CML dans les trois morphotypes. Les CML de morphotype allongé présente une plus faible expression de la vimentine et de

CapZ α , alors qu'une surexpression est observée pour les autres marqueurs des CML. Une surexpression est retrouvée pour les CML arrondies par rapport aux CML saines. Les marqueurs apoptotiques sont surexprimés dans les deux morphotypes de CML de l'AAA. L'expression de l'ARN messager d'ADAMTS 5 est augmentée dans les CML de l'AAA en comparaison aux CML saines (Figure 20).

Les limites de cette expérience sont la qualité de l'ARN. Le RIN pour *RNA integrity number* des échantillons est égal à 2,7 en moyenne sur les différents échantillons [min 2,3- max 2,9]. Les échantillons sont comparables mais les résultats peuvent être biaisés par la dégradation du matériel ARN.

L'étude d'ADAMTS 5 tissulaire ayant révélée une modulation de l'expression d'ADAMTS 5 entre l'AAA et l'aorte non anévrysmale et entre les deux morphotypes de CML observés dans l'AAA, l'expression d'ADAMTS 5 a été analysée dans le plasma de patients présentant un AAA et comparés à une population contrôle.

IV.3 Profil d'expression d'ADAMTS 5 dans le plasma

Dans un premier temps, nous avons évalué l'expression plasmatique d'ADAMTS 5 dans la population LILAS (Lamblin et al, 2010) et comparé avec une population de 8 patients sans AAA ni athérosclérose ("Contrôles"). Les résultats obtenus avec le test de Mann-Whitney confirme une diminution significative de la concentration plasmatique d'ADAMTS 5 chez les patients ayant un AAA (AAA) ($59,5 \pm 8,2$) comparés à la population "Contrôles" ($157,9 \pm 31,2$) sans athérosclérose ni AAA ($P < 0,0001$) (Figure 21). Aucune différence significative n'est observée entre la population avec un AAA et la population avec une athérosclérose sans AAA (AOMI) ($36,2 \pm 5,8$) ($P = 0,103$).

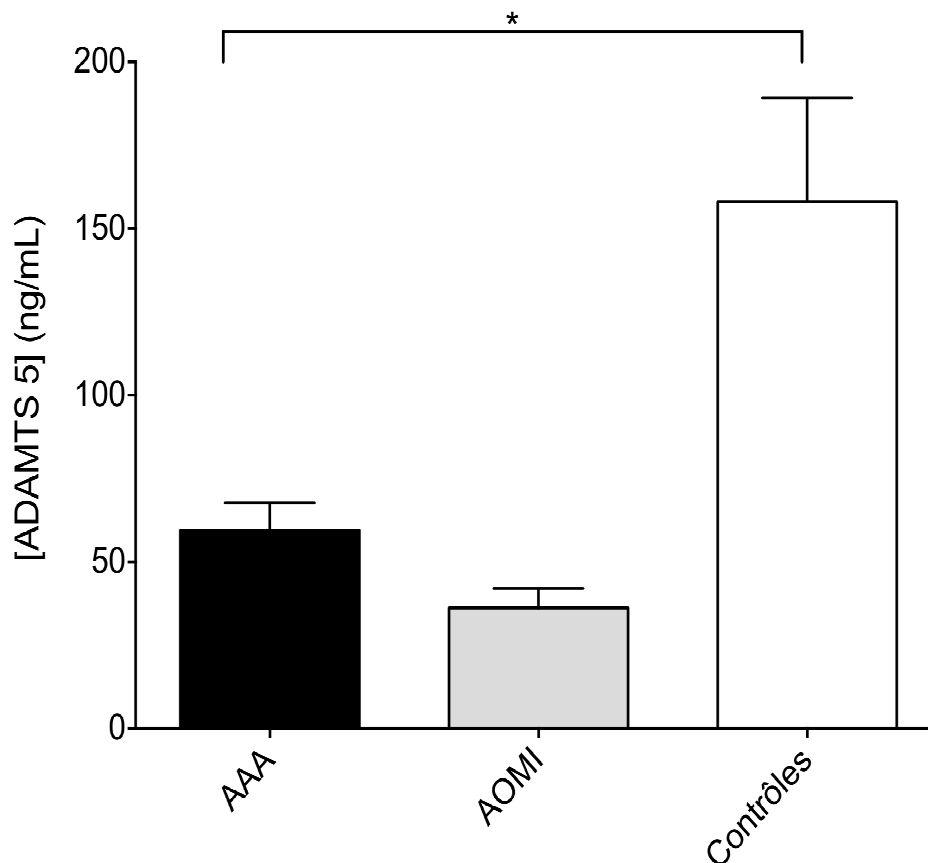


Figure 21 - Concentration d'ADAMTS 5 plasmatique dans les populations LILAS (AAA et AOMI) et dans une population de contrôles. Les données présentent la moyenne avec son écart-type. * $P < 0,05$.

Grâce à la collaboration avec le Pr Jes Lindholt (Odense, Danemark), nous avons eu accès à la banque de plasmas FAD pour *Fight Aneurysmal Disease*. Nous avons quantifié ADAMTS 5 chez 208 patients présentant un AAA, 199 patients présentant une athérosclérose et 176 patients sans AAA ni athérosclérose. Les analyses statistiques ont été réalisées sur les concentrations plasmatiques d'ADAMTS 5, exprimées en ng/mL, avec le logiciel GraphPad Prism. Le test de Student t a été utilisé pour comparer la population AAA avec la population de patients ayant une athérosclérose oblitérante des membres inférieurs (*PAD*) puis avec la population de contrôle ne présentant ni d'AAA ni d'athérosclérose (*Contrôles*). Les résultats de la concentration plasmatique de chaque population sont présentés sous la forme suivante: moyenne \pm écart-type à la moyenne, nombre de patients par groupe. Le seuil de significativité choisi est $P=0,05$.

L'analyse plasmatique révèle une diminution significative de la concentration plasmatique d'ADAMTS 5 dans la population AAA ($433,6 \pm 16,46$, $n=208$) par rapport à la population de patients athérosclérotiques ($511,1 \pm 24,09$, $n=199$) ($P=0,0078$). La diminution reste significative comparée à une population sans AAA ni athérosclérose ($499,7 \pm 19,48$, $n=176$) ($P=0,0094$). La concentration n'est pas significativement différente entre la population PAD et la population Control ($P=0,7187$) (Figure 22).

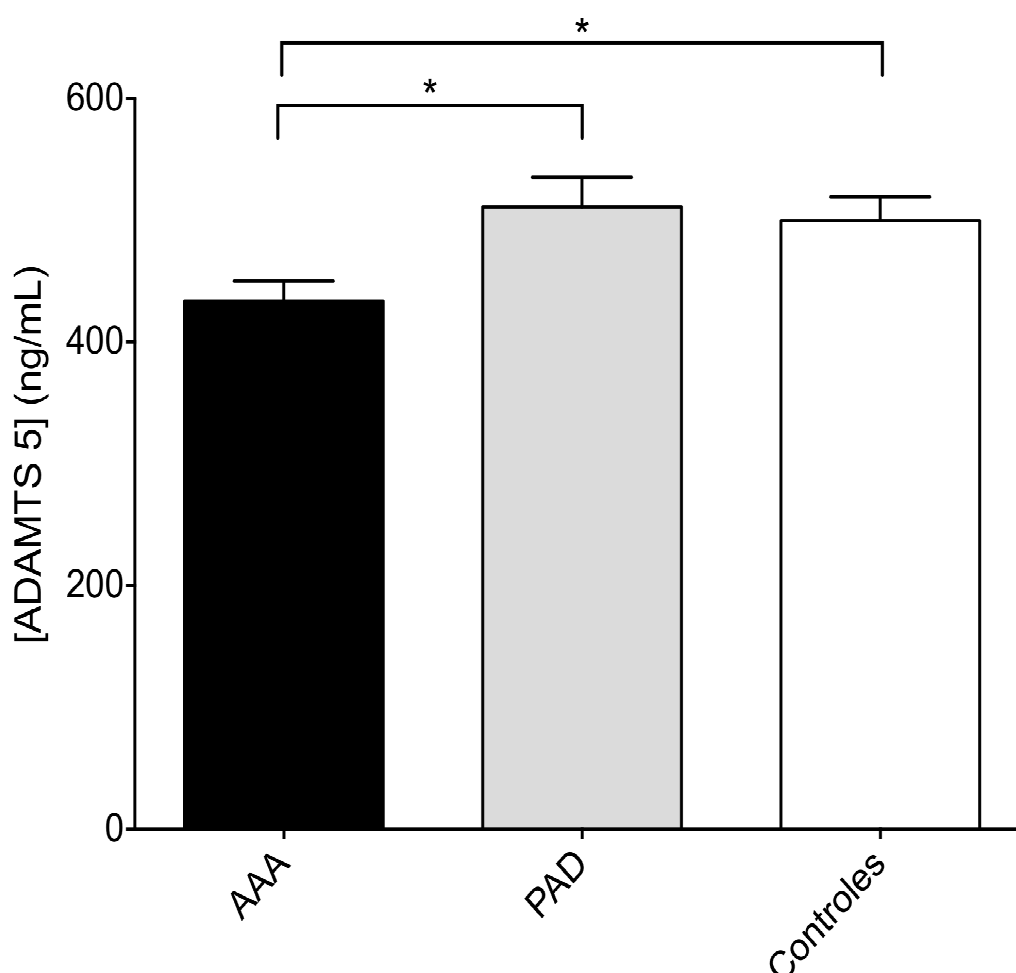


Figure 22 - Concentration d'ADAMTS 5 plasmatique dans les populations AAA, PAD et Contrôles. Les données présentent la moyenne avec son écart-type. * $P<0,01$.

L'analyse plasmatique révèle une diminution significative de la concentration plasmatique d'ADAMTS 5 dans la population AAA ($433,6 \pm 16,46$, $n=208$) par rapport à la population de patients athérosclérotiques ($511,1 \pm 24,09$, $n=199$) ($P=0,0078$). La diminution reste

significative comparée à une population sans AAA ni athérosclérose ($499,7 \pm 19,48$, $n=176$) ($P=0,0094$). La concentration n'est pas significativement différente entre la population *PAD* et la population *Contrôle* ($P=0,7187$) (Figure 22). La collaboration avec le Pr Lindholt permettra d'établir une éventuelle corrélation entre la concentration plasmatique d'ADAMTS 5 et les caractéristiques cliniques des patients obtenues au moment du recueil du prélèvement et au cours du suivi à long terme.

IV.4 Discussion

L'analyse histologique du tissu anévrysmal comparé au tissu aortique non anévrysmal a permis de mettre en évidence trois morphotypes de CML. Les CML issues du tissu sain sont de forme allongée au sein de la media contenant plusieurs couches de CML. Deux morphotypes distincts sont observés dans l'AAA. Les CML de morphotype allongé, similaire à celui de l'aorte saine et les CML de morphotype arrondi. Le morphotype arrondi des CML suggère la mise en apoptose de ce type cellulaire (Saraste et al, 2000). Une autre caractéristique morphologique est la diminution du volume nucléaire des CML de l'AAA. Les CML de morphotype arrondi ont un volume nucléaire inférieur à celui des CML de morphotype allongé pouvant évoquer l'apoptose de la cellule (Model, 2014).

La caractérisation des différents morphotypes de CML a pu être réalisée grâce au procédé de LMD permettant d'isoler les CML afin d'en analyser leur expression transcriptomique et protéique. L'expression d' α -SMA est similaire dans les 3 morphotypes. Par contre, la desmine, une protéine présente dans le sarcomère, appareil contractile de la CML différencie les CML de l'AAA des CML de l'aorte saine par un marquage moins intense dans les CML de l'AAA. De plus, la caspase 3 active est exprimée spécifiquement par les CML de morphotype arrondi.

Dans l'AAA, l'apoptose des CML a été décrite comme secondaire au détachement de la MEC sous le terme d'anoïkis (Michel JB, 2003). Nous avons donc émis l'hypothèse que dans l'AAA, les CML évoluent du morphotype sain vers le morphotype allongé de l'AAA et enfin vers le stade ultime, les CML de morphotype arrondi. Les CML arrondies sont en anoïkis. Nous avons donc caractérisé au sein de l'AAA deux morphotypes de CML dans l'AAA.

Ce profil évolutif des CML dans l'AAA est morphologique. L'expression d'un marqueur potentiel, l'ADAMTS 5, a été analysée au cours de cette évolution. L'ARN messager codant pour ADAMTS 5 est retrouvé surexprimé dans les CML de l'AAA par rapport aux CML saines. ADAMTS 5 est différenciellement exprimé entre les deux morphotypes de CML de l'AAA et par rapport aux CML saines. La présence de plusieurs bandes de poids moléculaire distinctes observées pour ADAMTS 5 avec les CML isolées par LMD suggère qu'il y a une modulation de différents fragments d'ADAMTS 5 obtenus par clivage de la protéine. L'analyse de la séquence protéique d'ADAMTS 5 avec le logiciel Expasy révèle que la caspase 1, impliquée dans l'inflammation et dans l'apoptose, peut cliver ADAMTS 5 au niveau des acides aminés 276 et 663 (Mariathasan et al, 2004). La thrombine, participant à l'inflammation et au processus de coagulation et largement étudiée dans l'AAA, est également capable de cliver ADAMTS 5 au niveau du résidu 285 (Abdelhamid et al, 2013). D'autre part, ADAMTS 5 et la caspase 3 ont été retrouvées modulées de façon similaire dans les lésions précoces de dégradation de la MEC dans l'arthrite (Tchetina et al, 2005). La même modulation se retrouve dans les CML de l'AAA suggérant une relation dans l'AAA entre le mécanisme d'apoptose, ADAMTS 5 et la dégradation de la MEC.

Le potentiel de biomarqueur d'ADAMTS 5 a été mis en évidence par son expression au niveau du plasma. ADAMTS 5 est retrouvée augmentée dans le plasma des patients présentant un AAA par rapport à une population athérosclérotique ayant les mêmes facteurs

de risque cardiovasculaires (Thompson et al, 2002) et par rapport à une population de patients sains.

L'analyse *a priori* d'ADAMTS 5 a permis la caractérisation de 2 morphotypes de CML qui présentent des profils d'expression distincts. Les CML peuvent évoluer d'un profil physiologique vers un profil pathologique anévrysmal. ADAMTS 5 participe à l'évolution du profil sain vers le morphotype allongé de l'AAA par la modulation des différentes sous-unités. L'activité enzymatique d'ADAMTS 5 peut être différente en fonction des sous-unités exprimées par la cellule. Ainsi, la dégradation de la MEC peut devenir pathologique par la modification du rôle d'ADAMTS 5 dans la paroi vasculaire. Au cours du processus de l'AAA, le mécanisme suivant peut être avancé suite aux résultats obtenus: les CML évoluent vers l'anoïkis secondairement à la dégradation de la MEC par ADAMTS 5. ADAMTS 5 est donc un marqueur potentiel de l'évolution des CML dans l'AAA et un marqueur d'intérêt de la pathologie anévrysmale.

IV.5 PRDX-1 et les deux sous-types de macrophages

Article: Rôle des macrophages pro-inflammatoires CD68+MR- dans l'expression de peroxiredoxine-1 dans les anévrismes de l'aorte abdominale chez l'homme - *Role of proinflammatory CD68(+) mannose receptor(-) macrophages in peroxiredoxin-1 expression and in abdominal aortic aneurysms in humans.*

Boytard L, Spear R, Chinetti-Gbaguidi G, Acosta-Martin AE, Vanhoutte J, Lamblin N, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;**33**, 431-438.

La PRDX-1 a été retrouvée dans une étude préalable au laboratoire comme surexprimée par les macrophages dérivés de monocytes en culture issus des patients avec un AAA (Lamblin et al, 2010). La distribution spécifique des macrophages M1 et M2 et leurs propriétés inflammatoires opposées nous a amené à poser l'hypothèse que la PRDX-1 est exprimée spécifiquement par un sous-type de macrophage dans l'AAA. Les macrophages de type M1 et M2 ont donc été isolés de l'AAA par LMD afin d'étudier leur expression pour PRDX-1. L'expression de cette enzyme antioxydante a été étudiée par RT-qPCR, Western-Blot et ELISA. L'isolement par LMD a été validé par l'analyse en RT-qPCR et en Western Blot de l'expression des marqueurs spécifiques de chaque sous-type de macrophages. Les cytokines proinflammatoires, TNF α et IL1 β , sont exprimées par les macrophages de type M1 et les facteurs anti-inflammatoires, MRC1 et CCL18, sont surexprimés par les macrophages de type M2 dans un but de cicatrisation tissulaire (Chinetti-Gbaguidi et al, 2011). L'étude ciblée sur l'expression de la PRDX-1 dans les macrophages de type M1 et M2 comme marqueur potentiel de l'AAA et discriminant les deux types de macrophages a également permis de valider l'utilisation de la LMD pour l'étude des cellules isolées de l'AAA.

Conclusion de l'article

Afin de confirmer que la microdissection réalisée permet l'isolement du type cellulaire d'intérêt, une analyse de l'expression des ARNs messagers et des protéines spécifiques des deux sous-types de macrophages a été réalisée. L'expression de TNF et Interleukine 1B (IL1B), exprimés par les macrophages M1 a été retrouvée dans les cellules isolées après identification par immunomarquage pour CD68+CD206-. L'expression de CCL18 et MRC1, marqueurs des macrophages M2, a été retrouvée surexprimée dans les macrophages identifiés en immunohistochimie par CD68+CD206+. La stabiline 1, marqueur de polarisation des macrophages en type M2, a été retrouvée surexprimée dans les cellules isolées CD68+CD206+. Les résultats confirment un isolement spécifique par LMD de chaque sous-type de macrophages. La stratégie d'analyse des ARNm et des protéines à partir des cellules isolées par LMD dans l'AAA est validée.

Les macrophages de type M1 et M2 de l'AAA chez l'Homme ont été isolés par LMD pour étudier leur rôle spécifique dans la modulation de la PRDX-1. L'expression de la PRDX-1, enzyme antioxydante a été retrouvée augmentée dans les macrophages de type M1 comparés aux macrophages de type M2. Ainsi, la surexpression qui avait été observée dans les macrophages en culture des patients AAA est secondaire à son expression par les macrophages M1 pro-inflammatoires. Le potentiel de biomarqueur circulant de l'AAA a été confirmé par le dosage plasmatique de la PRDX-1 dans la population LILAS (Lamblin et al, 2010) (Figure 23). La PRDX-1 plasmatique est significativement surexprimée dans chez les patients présentant un AAA ($P=0,02$).

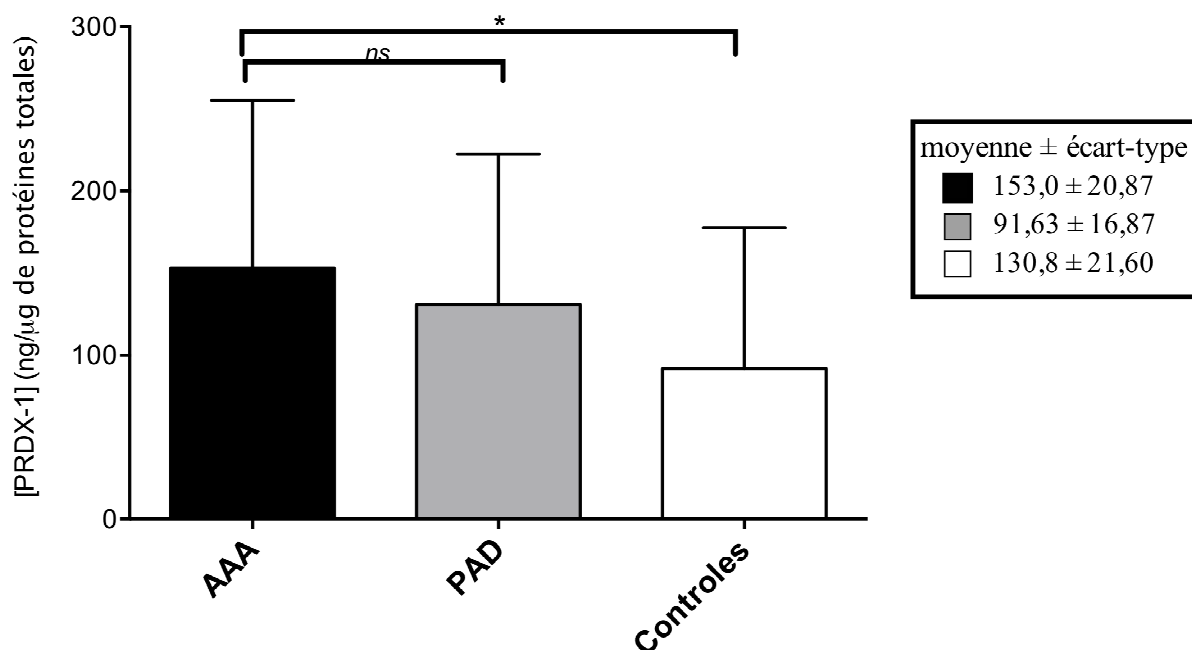


Figure 23 - Expression plasmatique de PRDX-1 chez les patients AAA(n=24), PAD(n=18) et Controles sans AAA ni athérosclérose (n=26). * correspond à $P=0,02$ (test de Student).

Les analyses complémentaires réalisées dans le plasma et exposées dans la thèse de Ludovic Boytard (2012) ont par ailleurs mis en évidence une expression plus faible de cette enzyme chez les femmes comparées aux hommes de la population contrôle, ainsi une étude sur une plus grande population est nécessaire afin d'analyser le potentiel de biomarqueur de PRDX-1 dans l'AAA selon le sexe. De façon intéressante, la MMP9 décrite comme une enzyme exprimée par les macrophages dans l'AAA (Thompson et al, 1995) ne diffère pas dans les deux sous types de macrophages isolés par LMD.

Approche sans *a priori* : vers une meilleure compréhension de l'AAA

L'approche sans *a priori* a été effectuée sur les cellules microdisséquées afin d'identifier des marqueurs de l'AAA pouvant améliorer la compréhension des mécanismes impliqués et responsable de l'AAA. Dans une première partie, les résultats présentés résultent de l'analyse des principales cellules participant à l'AAA, les macrophages de type M1 et M2 et les CML. Puis, cette approche a été utilisée sur les ATLOs identifiés dans l'AAA.

IV.6 Criblage des miARNs à partir des cellules isolées du tissu anévrysmal humain

Article: Criblage des microARNs des cellules isolées de l'anévrysme de l'aorte abdominal chez l'Homme. Let-7f, un nouveau biomarqueur circulant potentiel - *MicroRNA profiling of cells isolated from human abdominal aortic aneurysms. Let-7f, a new potential circulating biomarker.*

Spear R, Boytard L, Blervaque R, Chwastyniak M, Hot D, Vanhoutte J, Staels B, Lemoine Y, Lamblin N, Pruvot FR, Haulon S, Amouyel P, Pinet F

Soumis dans Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

Un criblage des miARNs exprimés par les cellules présentes dans la paroi anévrysmale, les macrophages M1 et M2 et les CML, a été effectué afin de mettre en évidence des miARNs, marqueurs potentiels de l'AAA pouvant aider à une meilleure compréhension de l'AAA et à identifier des biomarqueurs spécifiques de l'AAA. A l'heure actuelle, les miR-21 et mir-29b ont été identifiés comme des marqueurs de l'AAA dans les modèles murins (Maegdefessel et al, 2014). L'analyse transcriptomique porte sur les cellules isolées de la paroi anévrysmale chez l'Homme. Les cellules ont été localisées par immunomarquage, identifiant ainsi les différents types cellulaires dans la paroi anévrysmale: les macrophages de type M1 (CD68+CD206-), les macrophages de type M2 (CD68+CD206+) et les CML (α -SMA+). L'isolement des cellules a été réalisé par le procédé de microdissection laser validé dans l'étude préalablement présentée (Boytard et al, 2013). Le criblage réalisé sur puce à miARNs a été normalisé par rapport à l'expression des miARNs exprimés dans les CML saines. La sélection des miARNs issus de ce criblage a été analysée par RT-qPCR afin de déterminer l'expression différentielle des miARNs sélectionnés, marqueurs potentiels de l'AAA. L'analyse différentielle des cellules microdisséquées a également été comparée à celle du tissu global des parois d'AAA comparées aux parois contrôles. Le potentiel de biomarqueur a

ensuite été évalué par l'analyse différentielle des miARNs sélectionnés dans le plasma des patients de la population LILAS (Lamblin et al, 2010).

Conclusion de l'article

Les macrophages de type M1 et M2 sont localisés dans des tuniques opposées de la paroi anévrysmale. Les macrophages de type M1 à visée pro-inflammatoire sont retrouvés dans la partie intraluminale du thrombus alors que les macrophages de type M2 à visée anti-inflammatoire sont retrouvés dans l'adventice. Les CML sont retrouvées raréfiées dans la media de l'AAA. Les CML sont les seules cellules présentes dans les deux types de parois AAA et non AAA. Chaque groupe de cellules a été isolé par LMD à partir de biopsies de paroi aortique anévrysmale et saine d'au minimum deux patients différents. Les cellules utilisées comme contrôles pour l'analyse comparative sont les CML issues des aortes saines. Ainsi, grâce à la technologie de puce à miARNs, les miARNs exprimés par les CML anévrysmales (n=4), par les macrophages de type M1 (n=2) et de type M2 (n=2) ont été criblés en comparaison à l'expression des miARNs dans les CML de l'aorte saine. De cette analyse, nous avons détecté 92 miARNs dans l'ensemble des types cellulaires de l'AAA testés. De ces 92 miARNs, 10 ont été sélectionnés pour des analyses complémentaires du fait de leur intensité de signal. L'analyse différentielle des 10 miARNs dans les échantillons a été réalisée par RT-qPCR et révèle une expression similaire de 6 miARNs dans les trois types de cellules anévrysmales étudiées, les CML et les deux sous-types de macrophages. Cinq de ces 6 miARNs sont exprimés de façon similaire dans les biopsies entières. Let-7f est retrouvé surexprimé dans les CML anévrysmales mais n'est pas retrouvé modulé dans les biopsies totales anévrysmales comparées aux aortes saines. Dans le plasma, let-7f est retrouvé surexprimé dans les plasmas issus des patients présentant un AAA par rapport aux patients ayant une athérosclérose de la population *LILAS* (Lamblin et al, 2010). Nos résultats chez l'Homme montrent une diminution tissulaire du miR-29b dans les trois types cellulaires isolés de l'AAA et dans les biopsies totales. De façon similaire aux modèles murins d'AAA, le miR-29b est retrouvé diminué dans le tissu anévrysmal (Maegdefessel et al, 2012a). Par ailleurs, le

miR-21 impliqué dans l'apoptose est retrouvé exprimé à l'opposé dans chaque sous-type de macrophages. L'expression de miR-21 est retrouvée augmentée dans les macrophages anti-inflammatoires de type M2 et diminuée dans les macrophages pro-inflammatoires de type M1. Or, le miR-21 protège de l'apoptose des cellules de la paroi aortique lorsque son expression est augmentée (Maegdefessel et al, 2012b). Nos résultats confirment donc le rôle spécifique de chaque type cellulaire dans la paroi anévrysmale.

IV.7 Les microARNs des ATLOs

Article: Les organes adventitiels lymphoïdes tertiaires dans l'anévrisme de l'aorte abdominale sont une source potentielle de microARNs biomarqueurs - *Adventitial tertiary lymphoid organs in AAA are a potential source of miRNAs as biomarkers*

Spear R, Boytard L, Blervaque R, Chwastyniak M, Vanhoutte J, Hot D, Staels B, Lemoine Y, Lamblin N, Pruvot FR, Haulon S, Amouyel P, Pinet F

Soumis dans International Journal of Molecular Sciences

L'analyse histologique du tissu anévrysmal a été menée sur 20 biopsies afin d'analyser la distribution des cellules inflammatoires de l'AAA. Les neutrophiles sont impliqués dans l'AAA et ont un rôle dans le recrutement des autres cellules inflammatoires (Houard et al, 2009). Les macrophages M1 et M2 ont déjà été étudiés précédemment (Boytard et al, 2013). L'implication des lymphocytes dans l'AAA est moins bien définie. Les deux types de lymphocytes T et B sont retrouvés dans l'AAA (Reeps et al, 2009). Les lymphocytes sont décrits organisés en structure folliculaire dans les modèles athérosclérotiques de souris (Moos et al, 2005). Ces structures retrouvées dans l'adventice et essentiellement dans les aortes des souris apolipoprotéine E -/- sont décrites comme des ATLOs (Gräbner et al, 2009). Leur rôle dans l'orchestration de la réponse inflammatoire a été énoncé dans l'athérosclérose (Akhavanpoor et al, 2014). Notre analyse a donc porté sur les ATLOs et leur profil d'expression transcriptomique grâce au procédé de LMD et de criblage sur puce, précédemment décrits, dans le but de mettre en évidence de nouveaux marqueurs de l'AAA.

Conclusion de l'article

L'étude histologique a permis d'identifier une distribution spécifique des cellules inflammatoires impliquées dans l'AAA. Les macrophages de type M1 à visée pro-inflammatoire sont préférentiellement retrouvés dans l'adventice et à l'opposé, les macrophages de type M2 à visée anti-inflammatoire sont identifiés dans le TIL comme démontré précédemment (Boytaud et al, 2013). Les neutrophiles et les lymphocytes de type T sont observés dans le TIL alors que les lymphocytes de type B sont adventitiels. Les lymphocytes de type B ont été observés organisés en structure de type folliculaire, décrites précédemment comme ATLOs, dans 7 biopsies anévrysmales sur les 20 analysées (Bobryshev et al, 2005). Leur interaction avec les autres types cellulaires présentée dans l'athérosclérose nous a fait émettre l'hypothèse que les ATLOs expriment des marqueurs potentiels de l'AAA.

Leur expression transcriptomique a permis de mettre en évidence trois marqueurs potentiels, miR-15a*, miR-30a et miR-489 d'après leur intensité de signal dans les échantillons d'ATLOs étudiés (n=2). Leur expression différentielle dans les ATLOs a été normalisée par les CML saines, étant le seul type cellulaire commun aux deux parois. Nous avons comparé leur expression à celle des macrophages M1 et M2. Nous observons que le miR-15a* et le miR-489 sont exprimés de façon similaire dans les macrophages et les ATLOs alors que le miR-30a est exprimé de façon similaire uniquement dans les macrophages de type M1. Or, le miR-30a est retrouvé différentiellement exprimé dans les macrophages en réponse à une infection mycoplasmaïque (Das et al, 2013). Le miR-15a* est modulé de la même façon dans les ATLOs, les macrophages et les biopsies totales d'AAA mais le miR-489 est exprimé de façon opposée aux cellules inflammatoires isolées comparées aux biopsies totales. De façon intéressante, l'expression de miR-489 est modifiée par le traitement par l'angiotensine dans les cardiomyocytes (Wang et al, 2014).

L'étude plasmatique des patients de l'étude LILAS révèle une expression diminuée de miR-15a* et miR-30a de façon significative de la même façon que dans les ATLOs et dans les biopsies totales. Le miR-15a* est un miARN régulant l'angiogénèse (Sun et al, 2013) et les cytokines (Han et al, 2013). L'étude des ATLOs a donc permis de mettre en évidence des miARNs potentiels régulateurs des mécanismes biologiques impliqués dans l'AAA et des biomarqueurs potentiels de l'AAA.

IV.8 Conclusion

L'approche transcriptomique sans *a priori* a été menée sur les cellules isolées de l'AAA afin de mettre en évidence des marqueurs potentiels de l'AAA. En effet, la distribution spécifique mise en évidence par l'analyse histologique évoque la participation spécifique de chaque type cellulaire identifié dans l'AAA et donc une expression spécifique de marqueurs. Les miARNs ayant un rôle régulateur important sur les ARNm et les protéines mais aussi sur l'expression génique peuvent permettre une meilleure compréhension de l'AAA et mettre en évidence des marqueurs de l'AAA.

Les miRNAs de la famille miR-29, observés dans les modèles murins d'AAA (Maegdefessel et al, 2014), sont retrouvés parmi les 5 miARNs exprimés de façon similaire à la fois dans les cellules isolées de l'AAA et dans le tissu analysé dans sa totalité. Parmi ces 5 miARNs, le miR-451 est un miARN exprimé dans les globules rouges. Son expression plasmatique, diminuée dans le plasma des patients présentant un AAA, est opposée à celle retrouvée dans le tissu. Or le miR-451 est un miARN exprimé dans les cellules érythrocytaires. Sa présence dans les cellules isolées et dans les biopsies totales anévrysmales peut faire évoquer deux hypothèses. Une première hypothèse est la différence due à la pathologie dans laquelle de nombreux érythrocytes sont exprimés, notamment dans le TIL (Michel et al, 2011). La présence dans chacune des cellules isolées peut être en faveur d'une interaction importante entre les cellules du TIL et les cellules de l'adventice. Une autre hypothèse est que cette différence d'expression est secondaire aux conditions de prélèvement des biopsies. L'AAA est prélevé au cours de chirurgie ouverte alors que les biopsies saines sont prélevées au cours de prélèvements multiorganes après injection de soluté de conservation à travers l'aorte abdominale sous-rénale.

Deux miARNs, let-7f et miR-29b, ont été retrouvés significativement surexprimés dans le plasma des patients avec un AAA comparés aux patients présentant une atteinte

athérosclérotique sans AAA. Let-7f a été retrouvé dans l'athérosclérose au niveau de l'intima des parois vasculaires des patients présentant une artériopathie oblitérante des membres inférieurs (Li et al, 2011). De façon intéressante, let-7f est sous exprimé dans les deux sous-types de macrophages comparés aux CML saines et dans l'analyse du tissu anévrysmal global.

L'approche sans *a priori* ainsi réalisée des cellules isolées de l'AAA a permis de mettre en évidence une expression spécifique des miARNs de chaque type cellulaire exprimé dans l'AAA. Cette approche confirme les données des modèles animaux de l'AAA concernant le potentiel de biomarqueur de mir-29b dans la pathologie anévrysmale mais aussi met en évidence de nouveaux miARNs, le let-7f, le miR-15a* et le miR-30a en tant que biomarqueurs potentiels de l'AAA et qui, à notre connaissance n'ont pas été observés jusqu'à présent dans l'AAA.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

V CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, deux stratégies ont été utilisées afin de mieux comprendre la pathologie anévrysmale: l'approche sans *a priori* et l'analyse de protéines candidates.

Les deux approches reposent sur une étude du tissu AAA chez l'Homme. L'étude du tissu humain a l'avantage d'être le modèle le plus représentatif de la pathologie contrairement aux modèles animaux qui restent des modèles incomplets nécessitant l'action de molécules ou une action mécanique sur le tissu et pouvant induire des biais d'interprétation de la modulation des marqueurs potentiels. Toutefois, le tissu humain d'AAA correspond à un stade avancé de la pathologie puisque les AAA prélevés relèvent d'indication chirurgicale. L'analyse histologique a révélé une variabilité d'expression des différents types cellulaires dans l'AAA permettant de suggérer que les AAA analysés représentent un panel large de la pathologie. Des marqueurs précoces ou déclencheurs de la pathologie peuvent donc être méconnus. L'étude chez l'Homme nécessite de choisir un tissu contrôle adéquat. Au cours de nos analyses, l'aorte non anévrysmale de situation anatomique similaire a été choisie comme tissu contrôle.

La première étape de l'analyse était d'analyser la distribution des cellules vasculaires impliquées dans l'AAA. Le probable équilibre entre les cellules à visée pro-inflammatoires telles que les macrophages M1 de l'adventice et les cellules à visée anti-inflammatoires telles que les macrophages de type M2 du TIL a pu être évoqué du fait de leur distribution spécifique. Des structures adventitielles tertiaires, décrites auparavant (Bobryshev et al, 2001), ont été observées. Les ATLOs auraient un rôle probable dans la régulation des autres cellules inflammatoires (Akhavanpoor et al, 2014).

Cette analyse histologique était également indispensable à la localisation de zones d'intérêt pour l'isolement. Selon les observations de Sho et al (2005), l'étude de l'AAA a été menée sur

les cellules isolées par LMD. La LMD permet en effet d'étudier l'expression protéique et transcriptomique des cellules que nous souhaitons effectuer sans modifier leur phénotype par la culture (Chimenti et al, 2011). Afin d'étudier l'expression différentielle des marqueurs potentiels, le groupe de référence choisi était le groupe de CML issus de l'aorte saine. Ce choix résulte du fait que les CML étaient les seules cellules communes aux deux tissus. Les cellules endothéliales présentes dans le tissu sain n'ont pas été localisées lors de l'analyse des échantillons AAA et inversement, les cellules inflammatoires de l'AAA n'ont pas été mises en évidence dans l'aorte saine. Les zones enrichies en cellules d'intérêt ont été isolées et soumises à des analyses protéiques d'une part et à des analyses transcriptomiques d'autre part. Les analyses protéiques nécessitaient une quantité de matériel isolé importante correspondant à environ 40 mm² de surface. Il était donc nécessaire de localiser une zone ayant une surface par coupe suffisante. Les coupes soumises à la LMD sont de 18 µm et l'avancement d'une coupe à une autre augmente le risque de perdre la zone d'intérêt. L'immunomarquage était régulièrement réitéré (en moyenne toutes les 3 coupes soit environ à 0,5 mm de tissu) afin de confirmer la persistance de la zone au cours de la progression de l'isolement. L'analyse du tissu global ou des différentes couches de l'AAA peut masquer certains marqueurs potentiels. L'expression des miARNs du tissu global et du tissu isolé confirme cette observation. La complexité des mécanismes impliqués et la présence de cellules interagissant les unes avec les autres potentialisent la modulation de certains marqueurs mais à l'inverse diminue la modulation d'autres et est responsable d'une absence de modulation dans l'analyse globale.

A. Approche ciblée : les biomarqueurs potentiels de l'AAA

L'analyse protéomique différentielle du laboratoire a permis de mettre en évidence des marqueurs potentiels de l'AAA, la PRDX-1 et ADAMTS 5 (Lamblin et al, 2010). Ces marqueurs ont été étudiés plus précisément dans les cellules isolées de l'AAA. La PRDX-1 retrouvée modulée dans le plasma des patients présentant un AAA et analysée dans les

macrophages de type M1 et M2 est le reflet de l'expression des macrophages de type M1 de la paroi anévrysmale. Le rôle spécifique de chacun des sous-types de macrophages représentés dans l'AAA est donc mis en évidence par cette analyse des cellules une fois isolées du tissu.

L'évolution de la morphologie des CML observée dans le tissu a été validée par l'analyse de l'expression des marqueurs apoptotiques une fois les cellules isolées. Le rôle d'ADAMTS 5 dans l'anoïkis des CML anévrysmales a été mis en évidence, reliant le marqueur identifié par l'analyse sans *a priori* précédemment effectuée dans le plasma et sur les cellules en culture issues de patients présentant un AAA à un processus biologique de l'AAA (Lamblin et al, 2010).

ADAMTS 5 a également été identifiée dans la pathologie athérosclérotique par son rôle dans la rétention des lipoprotéines dans la paroi aortique (Didangelos et al, 2012). Son expression dans les macrophages humains a été retrouvée modulée par les cytokines impliquées dans l'athérosclérose (Ashlin et al, 2013). ADAMTS 5 semble donc être un acteur central des processus inflammatoires et apoptotiques impliqués dans l'AAA et pourrait être impliqué dès le début de la pathologie anévrysmale du fait de son rôle dans la régulation des LDLs dans la paroi aortique.

Des analyses statistiques complémentaires des résultats plasmatiques sont en cours, grâce à la collaboration du Pr J. Lindholt, afin d'établir un lien avec les données cliniques de la base de données des patients inclus aux résultats plasmatiques observés à la fois en comparaison avec les patients athérosclérotiques sans AAA et les patients non athérosclérotiques avec un AAA.

La détection de sous-unités d'ADAMTS 5 nécessite d'être explorée afin de répondre aux différentes hypothèses émises de modifications post-traductionnelles de la protéine ou l'action d'enzymes telles que les caspases (Mariathasan et al, 2004). Un modèle de culture cellulaire

de l'apoptose des CML pourrait apporter une réponse en étudiant l'effet de la modulation d'ADAMTS 5 sur le profil d'expression protéique et transcriptomique des CML apoptotiques. Des analyses préliminaires montrent l'obtention d'une modification morphologique et des marqueurs de l'apoptose des CML par l'action du succinobucol (Midwinter et al, 2012). La Figure 24 résume les résultats de cette mise au point.

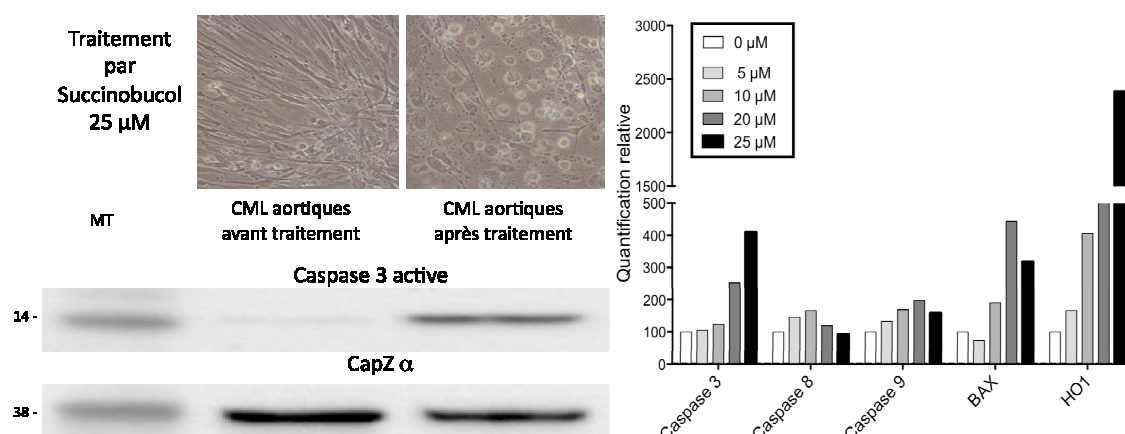


Figure 24 - Mise au point du traitement par 25 µM de succinobucol - Photos comparatives (en haut à gauche) des CML aortiques avant (photo de gauche) et après traitement par 25 µM de succinobucol à 24 heures (photos de droite) et expression en Western Blot de la caspase 3 active et CapZ α. Analyse de l'expression des ARN messagers des caspases 3, 8, 9, BAX et HO1 aux doses croissantes de traitement par succinobucol (à droite). Échantillon de référence CML non traitées et gène de référence, PPIA.

Le traitement par le succinobucol a été effectué à doses croissantes 5, 10, 20 et 25 µM pendant 24 heures. Les ARNm des caspases 3, 8, 9 et BAX, marqueurs de l'apoptose, et l'ARNm d'hème oxygénase-1 (HO1), marqueur du traitement par succinobucol ont été analysés par RT-qPCR et comparés à l'absence de traitement. A la dose de 25 µM, nous observons le morphotype arrondi des CML. L'expression de CapZ α confirme la persistance du phénotype des CML après le traitement. L'expression de la caspase 3 active et des autres marqueurs de l'apoptose à cette dose est retrouvée à la fois au niveau protéique et transcriptomique et HO1 est également augmenté. Ainsi, le traitement par 25 µM de succinobucol est capable d'induire l'apoptose des CML en culture. L'analyse d'ADAMTS 5 nécessitera donc des analyses supplémentaires en culture, la même approche sera effectuée

pour la PRDX-1 dans les deux sous-types de macrophages. Ceci permettra de définir le rôle de ces deux biomarqueurs potentiels dans l'AAA et d'éventuellement établir un lien avec les résultats de l'analyse sans *a priori*.

B. Approche sans *a priori* : vers une meilleure compréhension de l'AAA

La LMD a également permis l'analyse de l'expression des miARNs sans *a priori* à partir des cellules vasculaires isolées du tissu anévrysmal. Le criblage des miARNs par puce a permis de sélectionner des marqueurs potentiels de l'AAA. Ainsi, l'analyse comparative de l'expression du let-7f a mis en évidence son potentiel de marqueur qui a été confirmé par l'analyse plasmatique. Avec cette stratégie, des marqueurs ont pu être ignorés. L'analyse sur puce limite en effet les données aux miARNs connus et la sélection des miARNs pour les analyses ultérieures a été restrictive du fait d'un petit nombre d'échantillons testés. Le choix de la référence, les CML saines, peut également induire un biais de sélection puisque les valeurs sont comparées à un groupe de CML issu du tissu sain. Toutefois, le choix de sélectionner des miARNs détectés intensément sur la puce permettait d'éliminer les miARNs non modifiés dans la pathologie anévrysmale.

L'analyse des cellules isolées de l'AAA a permis d'identifier des miARNs impliqués dans la pathologie anévrysmale. Les 10 miARNs issus de l'analyse des macrophages et des CML sont modulés spécifiquement dans chaque cellule isolée. Parmi ces miARNs, miR-21, et les miARNs de la famille miR-29 sont décrits dans les modèles murins de l'AAA (Maegdefessel et al, 2014). L'approche effectuée chez l'Homme a donc permis de confirmer les données obtenues dans le modèle murin mais a également permis de détecter d'autres miARNs impliqués dans l'AAA tels que le let-7f uniquement observé dans l'athérosclérose (Li et al, 2011). De façon parallèle, le miR-15a* et le miR-30a ont été mis en évidence par l'analyse de l'expression des miARNs issus des ATLOs comme des biomarqueurs plasmatiques potentiels de l'AAA.

Afin de mettre en évidence le rôle de ces miARNs sélectionnés, une modulation de leur expression via des antagomiR et des *mimics* en culture, sur les macrophages de type M1 et M2 et sur les CML mises en apoptose, permettra l'analyse de leur rôle sur leurs cibles qui auront été identifiées par *mir pathway* (Van Rooij et al, 2012). *Mir pathway* est un logiciel répertoriant les cibles prédites et connues des miARNs. Les cibles des miARNs seront donc identifiées *a priori* et pourront permettre de juger de l'efficacité du traitement et d'analyser les conséquences sur les autres marqueurs protéiques et transcriptomiques potentiels de l'AAA détectés dans les études réalisées au laboratoire et dans la littérature.

Une technologie de l'approche sans *a priori* est décrite pour les miARNs: le séquençage en profondeur des ARNs (Van Rooij, 2011). Cette technologie permet de mettre en évidence des miARNs encore inconnus et des longs ARNs non codants. Dans une première étape, nous avons réalisé ce séquençage sur du tissu global anévrysmal comparé au tissu aortique global non anévrysmal. Les premières analyses confirment d'une part les analyses de la puce en détectant la modulation des miARNs sélectionnés tels que le miR-21 (augmenté d'un facteur 1,7), le miR-24 (augmenté d'un facteur 2), le miR-29c (augmenté d'un facteur 2,5) et le miR-451 (augmenté d'un facteur 5). De cette même analyse, des lncARNs ont été également détectés dans l'analyse comparative. Ainsi, cette technologie permettrait de détecter de nouveaux marqueurs de l'AAA par rapport à la technologie du criblage par puces. Suite à cette mise au point, nous réaliserons le séquençage en profondeur des cellules isolées de l'AAA. La limite de cette technologie est la quantité de matériel nécessaire qui est d'environ 1 µg. Une mise au point d'enrichissement des miARNs permettra de diminuer à 100 ng la quantité nécessaire au séquençage.

Les travaux de ma thèse réunissent donc deux approches complémentaires utiles pour améliorer la compréhension de l'AAA mais aussi afin d'en déterminer d'éventuels

biomarqueurs permettant un diagnostic ou une évaluation pronostique utile pour les prises de décisions thérapeutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VI RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdelhamid MF, Davies RS, Vohra RK, Adam DJ, Bradbury AW. Effect of endovascular and open abdominal aortic aneurysm repair on thrombin generation and fibrinolysis. *J Vasc Surg.* 2013;**57**, 103-107.
- Abdul-Hussien H, Soekhoe RG, Weber E, von der Thüsen JH, Kleemann R, Mulder A, van Bockel JH, Hanemaaijer R, Lindeman JH. Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases. *Am J Pathol.* 2007;**170**, 809-817.
- Acosta-Martin AE, Chwastyniak M, Beseme O, Drobecq H, Amouyel P, Pinet F. Impact of incomplete DNase I treatment on human macrophage proteome analysis. *Proteomics Clin Appl.* 2009;**3**, 1236-1246.
- Acosta-Martin AE, Panchaud A, Chwastyniak M, Dupont A, Juthier F, Gautier C, Jude B, Amouyel P, Goodlett DR, Pinet F. Quantitative mass spectrometry analysis using PACIFIC for the identification of plasma diagnostic biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *PLoS One.* 2011;**6**, e28698.
- Adolph R, Vorp DA, Steed DL, Webster MW, Kameneva MV, Watkins SC. Cellular content and permeability of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 1997;**25**, 916-926.
- Aggarwal S, Qamar A, Sharma V, Sharma A. Abdominal aortic aneurysm: A comprehensive review. *Exp Clin Cardiol.* 2011;**16**, 11-15.
- Alcorn H, Wolfson S, Sutton-Tyrrell K, Kuller L, O'Leary D. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in the cardiovascular health study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;**16**, 963-970.
- Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg.* 1994; **19**: 446-456.
- Allaire E, Hasenstab D, Kenagy R, Starcher B, Clowes MM, Clowes AW. Prevention of aneurysm development and rupture by local overexpression of plasminogen activator inhibitor-1. *Circulation.* 1998;**98**, 249 –255
- Alsac JM, Delbosc S, Rouer M, Journé C, Louedec L, Meilhac O, Michel JB. Fucoidan interferes with Porphyromonas gingivalis-induced aneurysm enlargement by decreasing neutrophil activation. *J Vasc Surg.* 2013;**57**, 796-805.
- Anidjar S, Osborne-Pellegrin M, Coutard M, Michel JB. Arterial hypertension and aneurysmal dilatation. *Kidney Int Suppl.* 1992; **37**, S61-66.

Akhavanpoor M., Wangler S., Gleissner C.A., Korosoglou G., Katus H.A., Erbel C. Adventitial inflammation and its interaction with intimal atherosclerotic lesions. *Front Physiol* 2014; **5**, 296.

Ashlin TG, Kwan AP, Ramji DP. Regulation of ADAMTS-1, -4 and -5 expression in human macrophages: differential regulation by key cytokines implicated in atherosclerosis and novel synergism between TL1A and IL-17. *Cytokine*. 2013;**64**, 234-242.

B

Battle T, Arnal JF, Challah M, Michel JB. Selective isolation of rat aortic wall layers and their cell types in culture--application to converting enzyme activity measurement. *Tissue Cell*. 1994;**26**, 943-955.

Baxter BT, Pearce WH, Waltke EA, Littooy FN, Hallett JW, Jr, Kent KC, Upchurch GR, Jr, Chaikof EL, Mills JL, Fleckten B, Longo GM, Lee JK, Thompson RW. Prolonged administration of doxycycline in patients with small asymptomatic abdominal aortic aneurysms: report of a prospective (phase II) multicenter study. *J Vasc Surg*. 2002;**36**, 1-12.

Becker RC. Emerging paradigms, platforms, and unifying themes in biomarker science. *J Am Coll Cardiol*. 2007;**50**, 1777-1780.

Bengtsson H, Bergqvist D, Ekberg O, Janzon L. A population based screening of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Surg*. 1991;**5**, 53-57.

Biros E, Norman PE, Walker PJ, Nataatmadja M, West M, Golledge J. A single nucleotide polymorphism in exon 3 of the kallikrein 1 gene is associated with large but not small abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2011; **217**, 452-457.

Blanchard J, Armenian H, Friesen P. Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. *Am J Epidemiol*. 2000;**151**, 575-583.

Blann AD, Devine C, Amiral J, McCollum CN. Soluble adhesion molecules, endothelial markers and atherosclerosis risk factors in abdominal aortic aneurysm: a comparison with claudicants and healthy controls. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998;**9**, 479-484.

Bobryshev YV, Lord RS. Vascular-associated lymphoid tissue (VALT) involvement in aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2001;**154**, 15-21.

Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009;**324**, 1710-1713.

Bown MJ, Lloyd GM, Sandford RM, Thompson JR, London NJ, Samani NJ, Sayers RD. The interleukin-10-1082 'A' allele and abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2007;**46**, 687-693.

Bown MJ, Jones GT, Harrison SC, Wright BJ, Bumpstead S, Baas AF, Gretarsdottir S, Badger SA, Bradley DT, Burnand K, Child AH, Clough RE, Cockerill G, Hafez H, Scott DJ, Futers S, Johnson A, Sohrabi S, Smith A, Thompson MM, van Bockxmeer FM, Waltham M, Matthiasson SE, Thorleifsson G, Thorsteinsdottir U, Blankensteijn JD, Teijink JA, Wijmenga C, de Graaf J,

Kiemeney LA, Assimes TL, McPherson R; CARDIoGRAM Consortium; Global BPgen Consortium; DIAGRAM Consortium; VRCNZ Consortium, Folkersen L, Franco-Cereceda A, Palmen J, Smith AJ, Sylviu N, Wild JB, Refstrup M, Edkins S, Gwilliam R, Hunt SE, Potter S, Lindholt JS, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Hughes AE, Golledge J, Norman PE, van Rij A, Powell JT, Eriksson P, Stefansson K, Thompson JR, Humphries SE, Sayers RD, Deloukas P, Samani NJ. Abdominal aortic aneurysm is associated with a variant in low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Am J Hum Genet.* 2011;**89**, 619-627.

Boytard L, "Analyse moléculaire des types cellulaires impliqués dans l'anévrisme de l'aorte abdominale", Thèse de Doctorat d'Université en Sciences de la Vie et de la Santé, sous la direction du Docteur Pinet, Lille, Université du Droit et de la Santé de Lille, 2012, 226p, accessible sur <http://www.theses.fr/2012LILS035/document>.

Boytard L, Spear R, Chinetti-Gbaguidi G, Acosta-Martin AE, Vanhoutte J, Lamblin N, Staels B, Amouyel P, Haulon S, Pinet F. Role of proinflammatory CD68(+) mannose receptor(-) macrophages in peroxiredoxin-1 expression and in abdominal aortic aneurysms in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;**33**, 431-438.

Bradley DT, Hughes AE, Badger SA, Jones GT, Harrison SC, Wright BJ, Bumpstead S, Baas AF, Grétarsdóttir S, Burnand K, Child AH, Clough RE, Cockerill G, Hafez H, Scott DJ, Ariëns RA, Johnson A, Sohrabi S, Smith A, Thompson MM, van Bockxmeer FM, Waltham M, Matthíasson SE, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Blankensteijn JD, Teijink JA, Wijmenga C, de Graaf J, Kiemeney LA, Wild JB, Edkins S, Gwilliam R, Hunt SE, Potter S, Lindholt JS, Golledge J, Norman PE, van Rij A, Powell JT, Eriksson P, Stefánsson K, Thompson JR, Humphries SE, Sayers RD, Deloukas P, Samani NJ, Bown MJ. A variant in LDLR is associated with abdominal aortic aneurysm. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;**6**, 498-504.

Brady AR, Thompson SG, Fowkes FG, Greenhalgh RM, Powell JT; UK Small Aneurysm Trial Participants. Abdominal aortic aneurysm expansion: risk factors and time intervals for surveillance. *Circulation.* 2004;**110**, 16-21.

Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW Jr, Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS; Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg.* 2003;**37**, 1106-1117.

Brown PM, Zelt DT, Sobolev B. The risk of rupture in untreated aneurysms: the impact of size, gender, and expansion rate. *J Vasc Surg.* 2003;**37**, 280-284.

C

Caligiuri G, Rossignol P, Julia P, Groyer E, Mouradian D, Urbain D, Misra N, Ollivier V, Sapoval M, Boutouyrie P, Kaveri SV, Nicoletti A, Lafont A. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in patients with atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;**26**, 618-623.

Cassis LA, Gupte M, Thayer S, Zhang X, Charnigo R, Howatt DA, Rateri DL, Daugherty A. ANG II infusion promotes abdominal aortic aneurysms independent of increased blood pressure in hypercholesterolemic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;**296**, 1660-1665.

- Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol.* 1981;**89**, 379-383.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2005;**33**, e179.
- Chen Z, Ichetovkin M, Kurtz M, Zycband E, Kawka D, Woods J, He X, Plump AS, Hailman E. Cholesterol in human atherosclerotic plaque is a marker for underlying disease state and plaque vulnerability. *Lipids Health Dis.* 2010;**9**, 61.
- Chertov O, Ueda H, Xu LL, Tani K, Murphy WJ, Wang JM, Howard OM, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med.* 1997; **186**, 739-747.
- Chimenti C, Pieroni M, Russo A, Sale P, Russo MA, Maseri A, Frustaci A. Laser microdissection in clinical cardiovascular research. *Chest.* 2005;**18**, 2876-2881.
- Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhlef MA, Vanhoutte J, Copin C, Sebt Y, Derudas B, Mayi T, Bories G, Tailleux A, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Staels B. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRalpha pathways. *Circ. Res.* 2011;**108**, 985-995.
- Chiou AC, Chiu B, Pearce WH. Murine aortic aneurysm produced by periarterial application of calcium chloride. *J Surg.Res.* 2001; **99**, 371-376.
- Choke E, Vijaynagar B, Thompson J, Nasim A, Bown MJ, Sayers RD. Changing epidemiology of abdominal aortic aneurysms in England and Wales: older and more benign? *Circulation.* 2012;**125**, 1617-1625.
- Chun KC, Teng KY, Chavez LA, Van Spyk EN, Samadzadeh KM, Carson JG, Lee ES. Risk factors associated with the diagnosis of abdominal aortic aneurysm in patients screened at a regional Veterans Affairs health care system. *Ann Vasc Surg.* 2014;**28**, 87-92.
- Collège National des Enseignants de Médecine Vasculaire. Polycopié National de Pathologie Vasculaire. Septembre 2013. [consulté le 26/10/14]. Disponibilité sur Internet: <<http://cemv.vascular-e-learning.net/poly/131B.pdf>>
- Cohen JR, Parikh S, Grella L, Sarfati I, Corbie G, Danna D, Wise L. Role of the neutrophil in abdominal aortic aneurysm development. *Cardiovasc Surg.* 1993;**1**, 373-376.
- Collin J, Walton J, Araujo L, Lindsell D. Oxford screening programme for abdominal aortic aneurysm in men aged 65 to 74 years. *Lancet.* 1988;**2**, 613-615.
- Cotlar 2006 - Cotlar MJ. Giant cell arteritis complicated by aortic aneurysmal disease. *J Insur Med.* 2006;**38**, 136-138.
- Coutard M, Touat Z, Houard X, Leclercq A, Michel JB. Thrombus versus wall biological activities in experimental aortic aneurysms. *J Vasc Res.* 2010;**47**, 355-366.

Creighton CJ, Reid JG, Gunaratne PH. Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief Bioinform.* 2009;**10**, 490-497.

Cronin O, Walker PJ, Golledge J. The association of obesity with abdominal aortic aneurysm presence and growth. *Atherosclerosis.* 2013;**226**, 321-327.

Curci JA, Mao D, Bohner DG, Allen BT, Rubin BG, Reilly JM, Sicard GA, Thompson RW. Preoperative treatment with doxycycline reduces aortic wall expression and activation of matrix metalloproteinases in patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2000;**31**, 325-342.

D

Davies MJ. Aortic aneurysm formation: lessons from human studies and experimental models. *Circulation.* 1998;**98**, 193-195.

Davis V, Persidskaia R, Baca-Regen L, Itoh Y, Nagase H, Persidsky Y, Ghorpade A, Baxter BT. Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 ;**18**, 1625-1633.

Dawson J, Cockerill GW, Choke E, Belli AM, Loftus I, Thompson MM. Aortic aneurysms secrete interleukin-6 into the circulation. *J Vasc Surg.* 2007;**45**, 350–356.

Das K, Saikolappan S, Dhandayuthapani S. Differential expression of miRNAs by macrophages infected with virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* (Edinb) 2013;**93 Suppl**, S47-50.

De Haro J, Acin F, Bleda S, Varela C, Medina FJ, Esparza L. Prediction of asymptomatic abdominal aortic aneurysm expansion by means of rate of variation of C-reactive protein plasma levels. *J Vasc Surg.* 2012;**56**, 45-52.

Delbosc S, Alsac JM, Journe C, Louedec L, Castier Y, Bonnaure-Mallet M, Ruimy R, Rossignol P, Bouchard P, Michel JB, Meilhac O. Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PLoS One.* 2011;**6**, e18679.

Didangelos A, Mayr U, Monaco C, Mayr M. Novel role of ADAMTS-5 protein in proteoglycan turnover and lipoprotein retention in atherosclerosis. *J Biol Chem.* 2012;**287**, 19341-18345.

Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;**28**, 812-819.

Dupont A, Tokarski C, Dekeyzer O, Guihot AL, Amouyel P, Rolando C, Pinet F. Two-dimensional maps and databases of the human macrophage proteome and secretome. *Proteomics.* 2004;**4**, 1761-1778.

Dupont A, Corseaux D, Dekeyzer O, Drobecq H, Guihot AL, Susen S, Vincentelli A, Amouyel P, Jude B, Pinet F. The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. *Proteomics.* 2005 Feb;**5**, 585-596.

E

Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;**7**, 337-343.

Ehrlichman LK, Ford JW, Roelofs KJ, Tedeschi-Filho W, Futchko JS, Ramacciotti E, Eliason JL, Henke PK, Upchurch GR Jr. Gender-dependent differential phosphorylation in the ERK signaling pathway is associated with increased MMP2 activity in rat aortic smooth muscle cells. *J Surg Res.* 2010;**160**, 18-24.

Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, Sinha I, Ford JW, Deogracias MP, Roelofs KJ, Woodrum DT, Ennis TL, Henke PK, Stanley JC, Thompson RW, Upchurch GR, Jr. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation.* 2005;**112**, 232-240.

A- Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjärn M, Hansen HF, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup EM, Kauppinen S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.* 2008;**452**, 896-899.

B- Elmén J, Lindow M, Silahatoglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, Hedtjärn M, Hansen JB, Hansen HF, Straarup EM, McCullagh K, Kearney P, Kauppinen S. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res.* 2008;**36**, 1153-1162.

Elmore JR, Obmann MA, Kuivaniemi H, Tromp G, Gerhard GS, Franklin DP, Boddy AM, Carey DJ. Identification of a genetic variant associated with abdominal aortic aneurysms on chromosome 3p12.3 by genome wide association. *J Vasc Surg.* 2009;**49**, 1525-1531.

Eugster T, Huber A, Obeid T, Schwegler I, Gürke L, Stierli P. Aminoterminal propeptide of type III procollagen and matrix metalloproteinases-2 and -9 failed to serve as serum markers for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;**29**, 378-382.

F

Folkesson M, Kazi M, Zhu C, Silveira A, Hemdahl AL, Hamsten A, Hedin U, Swedenborg J, Eriksson P. Presence of NGAL/MMP-9 complexes in human abdominal aortic aneurysms. *Thromb Haemost.* 2007;**98**, 427-433.

Fontaine V, Jacob MP, Houard X, Rossignol P, Plissonnier D, Angles-Cano E, Michel JB. Involvement of the mural thrombus as a site of protease release and activation in human aortic aneurysms. *Am. J. Pathol.* 2002;**161**, 1701-1710.

Fowkes FG, Anandan CL, Lee AJ, Smith FB, Tzoulaki I, Rumley A, Powell JT, Lowe GD. Reduced lung function in patients with abdominal aortic aneurysm is associated with activation of inflammation and hemostasis, not smoking or cardiovascular disease. *J Vasc Surg.* 2006;**43**, 474-480.

G

Gadowski GR, Ricci MA, Hendley ED, Pilcher DB. Hypertension accelerates the growth of experimental aortic aneurysms. *J Surg Res.* 1993;**54**, 431-436.

- Gamberi T, Puglia M, Guidi F, Magherini F, Bini L, Marzocchini R, Modesti A, Modesti PA. A proteomic approach to identify plasma proteins in patients with abdominal aortic aneurysm. *Mol Biosyst.* 2011;**7**, 2855-2862.
- Ghigliotti G, Barisione C, Garibaldi S, Brunelli C, Palmieri D, Spinella G, Pane B, Spallarossa P, Altieri P, Fabbi P, Sambuceti G, Palombo D. CD16(+) monocyte subsets are increased in large abdominal aortic aneurysms and are differentially related with circulating and cell-associated biochemical and inflammatory biomarkers. *Dis Markers.* 2013;**34**, 131-142.
- Golledge J, Karan M, Moran CS, Muller J, Clancy P, Dear AE, Norman PE. Reduced expansion rate of abdominal aortic aneurysms in patients with diabetes may be related to aberrant monocyte-matrix interactions. *Eur Heart J.* 2008;**29**, 665-672.
- Golledge J, van Bockxmeer F, Jamrozik K, McCann M, Norman PE. Association between serum lipoproteins and abdominal aortic aneurysm. *Am J Cardiol.* 2010;**105**, 1480-1484.
- Golledge J, Muller J, Shephard N, Clancy P, Smallwood L, Moran C, Dear AE, Palmer LJ, Norman PE. Association between osteopontin and human abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;**27**, 655-660.
- Golub LM, Lee HM, Lehrer G, Nemiroff A, McNamara TF, Kaplan R, Ramamurthy NS. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res.* 1983;**18**, 516-526.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;**3**, 23-35.
- Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Mordhorst CH, Saikku P, Thom DH, Wang SP. A new respiratory tract pathogen: Chlamydia pneumoniae strain TWAR. *J Infect.Dis.* 1990; **161**, 618-625.
- Gretarsdottir S, Baas AF, Thorleifsson G, Holm H, den Heijer M, de Vries JP, Kranendonk SE, Zeebregts CJ, van Sterkenburg SM, Geelkerken RH, van Rij AM, Williams MJ, Boll AP, Kostic JP, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Walters GB, Masson G, Sulem P, Saemundsdottir J, Mouy M, Magnusson KP, Tromp G, Elmore JR, Sakalihan N, Limet R, Defraigne JO, Ferrell RE, Ronkainen A, Ruigrok YM, Wijmenga C, Grobbee DE, Shah SH, Granger CB, Quyyumi AA, Vaccarino V, Patel RS, Zafari AM, Levey AI, Austin H, Girelli D, Pignatti PF, Olivieri O, Martinelli N, Malerba G, Trabetti E, Becker LC, Becker DM, Reilly MP, Rader DJ, Mueller T, Dieplinger B, Haltmayer M, Urbonavicius S, Lindblad B, Gottsäter A, Gaetani E, Pola R, Wells P, Rodger M, Forgie M, Langlois N, Corral J, Vicente V, Fontcuberta J, España F, Grarup N, Jørgensen T, Witte DR, Hansen T, Pedersen O, Aben KK, de Graaf J, Holewijn S, Folkersen L, Franco-Cereceda A, Eriksson P, Collier DA, Stefansson H, Steinthorsdottir V, Rafnar T, Valdimarsson EM, Magnadottir HB, Sveinbjornsdottir S, Olafsson I, Magnusson MK, Palmason R, Haraldsdottir V, Andersen K, Onundarson PT, Thorgeirsson G, Kiemeny LA, Powell JT, Carey DJ, Kuivaniemi H, Lindholt JS, Jones GT, Kong A, Blankensteijn JD, Matthiasson SE, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Genome-wide association study identifies a sequence variant within the DAB2IP gene conferring susceptibility to abdominal aortic aneurysm. *Nat Genet.* 2010;**42**, 692-697.

H

- Hahn DL, Golubjatnikov R. Smoking is a potential confounder of the Chlamydia pneumoniae-coronary artery disease association. *Arterioscler Thromb*. 1992; **12**, 945-947.
- Halme S, Juvonen T, Laurila A, Juvonen J, Mosorin M, Saikku P, Surcel HM. Chlamydia pneumoniae reactive T lymphocytes in the walls of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Invest*. 1999; **29**, 546-552.
- Han H., Wang YH, Qu GJ, Sun TT, Li FQ, Jiang W, Luo SS. Differentiated miRNA expression and validation of signaling pathways in apoE gene knockout mice by cross-verification microarray platform. *Exp Mol Med*. 2013;**45**, e13.
- Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;**23**, 1510-1502.
- Hattori N, Carrino DA, Lauer ME, Vasanji A, Wylie JD, Nelson CM, Apte SS. Pericellular versican regulates the fibroblast-myofibroblast transition: a role for ADAMTS5 protease-mediated proteolysis. *J Biol Chem*. 2011;**286**, 34298-34310.
- Haute Autorité de Santé. (page consultée le 26/10/14). Recommandations en Santé Publique. Pertinence de la mise en place d'un programme de dépistage des anévrismes de l'aorte abdominale en France [en ligne]. http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-02/aaa_rapport_versfinale.pdf.
- Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittemore AD, Knox J, Libby P. Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 1999;**99**, 96-104.
- Helgadottir A, Thorleifsson G, Magnusson KP, Grétarsdottir S, Steinthorsdottir V, Manolescu A, Jones GT, Rinkel GJ, Blankensteijn JD, Ronkainen A, Jääskeläinen JE, Kyo Y, Lenk GM, Sakalihasan N, Kostulas K, Gottsäter A, Flex A, Stefansson H, Hansen T, Andersen G, Weinsheimer S, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Shah SH, Quyyumi AA, Granger CB, Reilly MP, Austin H, Levey AI, Vaccarino V, Palsdottir E, Walters GB, Jonsdottir T, Snorraddottir S, Magnusdottir D, Gudmundsson G, Ferrell RE, Sveinbjornsdottir S, Hernesniemi J, Niemelä M, Limet R, Andersen K, Sigurdsson G, Benediktsson R, Verhoeven EL, Teijink JA, Grobbee DE, Rader DJ, Collier DA, Pedersen O, Pola R, Hillert J, Lindblad B, Valdimarsson EM, Magnadottir HB, Wijmenga C, Tromp G, Baas AF, Ruigrok YM, van Rij AM, Kuivaniemi H, Powell JT, Matthiasson SE, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. *Nat Genet*. 2008;**40**, 217-224.
- Hinterseher I, Krex D, Kuhlich E, Pilarsky C, Schneiders W, Saeger HD, Bergert H. Analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 gene polymorphisms in a caucasian population with abdominal aortic aneurysms. *Zentralbl Chir*. 2008;**133**, 332-337.
- Hinterseher I, Tromp G, Kuivaniemi H. Genes and abdominal aortic aneurysm. *Ann Vasc Surg*. 2011; **25**, 388-412.
- Houard X, Touat Z, Ollivier V, Louedec L, Philippe M, Sebbag U, Meilhac O, Rossignol P, Michel JB. Mediators of neutrophil recruitment in human abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc. Res*. 2009;**82**, 532-541.

Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, Dalby CM, Robinson K, Stack C, Latimer PA, Hare JM, Olson EN, van Rooij E. Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res*. 2012;**110**, 71-81.

I

Irizarry E, Newman KM, Gandhi RH, Nackman GB, Halpern V, Wishner S, Scholes JV, Tilson MD. Demonstration of interstitial collagenase in abdominal aortic aneurysm disease. *J Surg Res*. 1993;**54**, 571-574.

Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*. 2007;**31**, 367-373.

Isselbacher EM. Thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 2005;**111**, 816-828.

J

Jamrozik K, Norman PE, Spencer CA, Parsons RW, Tuohy R, Lawrence- Brown MM, Dickinson JA. Screening for abdominal aortic aneurysms: lessons from a population-based study. *Med J Aust*. 2000;**173**, 345–350.

Jin J, Arif B, Garcia-Fernandez F, Ennis TL, Jin J, Davis EC, Thompson RW, Curci JA. Novel mechanism of aortic aneurysm development in mice associated with smoking and leukocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;**32**, 2901–2909.

Jones SC, Saunders HJ, Pollock CA. High glucose increases growth and collagen synthesis in cultured human tubulointerstitial cells. *Diabet.Med*. 1999; **16**, 932-938.

Juvonen J, Juvonen T, Laurila A, Alakarppa H, Lounatmaa K, Surcel HM, Leinonen M, Kairaluoma MI, Saikku P. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in the walls of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1997; **25**, 499-505.

Juvonen J, Surcel HM, Satta J, Teppo AM, Bloigu A, Syrjälä H, Airaksinen J, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T. Elevated circulating levels of inflammatory cytokines in patients with abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;**17**, 2843-2847.

K

Kallappa Parameshwarappa S, Mandjiny N, Kavumkal Rajagopalan B, Radhakrishnan N, Samavedam S, Unnikrishnan M. Intact giant abdominal aortic aneurysm due to Takayasu arteritis. *Ann Vasc Surg*. 2013;**27**, 671.e11-4.

Kanagasabay R, Gajraj H, Pointon L, Scott A. Co-morbidity in patients with abdominal aortic aneurysm. *J Med Screen*. 1996;**3**, 208-210.

Kaneko H, Anzai T, Horiuchi K, Kohno T, Nagai T, Anzai A, Takahashi T, Sasaki A, Shimoda M, Maekawa Y, Shimizu H, Yoshikawa T, Okada Y, Yozu R, Fukuda K. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is a key mediator of abdominal aortic aneurysm development. *Atherosclerosis*. 2011;**218**, 470-478.

- Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Duttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermüller J, Hofacker IL, Bell I, Cheung E, Drenkow J, Dumais E, Patel S, Helt G, Ganesh M, Ghosh S, Piccolboni A, Sementchenko V, Tammana H, Gingeras TR. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*. 2007;**316**,1484-1488.
- Kazi M, Zhu C, Roy J, Paulsson-Berne G, Hamsten A, Swedenborg J, Hedin U, Eriksson P. Difference in matrix-degrading protease expression and activity between thrombus-free and thrombus-covered wall of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;**25**, 1341-1346.
- Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, Riles TS, Manganaro A, Moskowitz AJ, Gelijns AC, Greco G. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg*. 2010;**52**, 539-548.
- Kent OA, McCall MN, Cornish TC, Halushka MK. Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2014;**42**, 7528-7538.
- Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, Pearce WH. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol*. 1990;**137**, 1199-1213.
- Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*. 1998; **98**, 300-307.
- Kölbel T, Strandberg K, Donath T, Mattiasson I, Stenflo J, Lindblad B. Activated protein C-protein C inhibitor complex in patients with abdominal aortic aneurysms: is it associated with diameter and growth rate? *Vasc Endovascular Surg*. 2008;**42**, 135-140.
- Koole D, Hurks R, Schoneveld A, Vink A, Golledge J, Moran CS, de Kleijn DP, van Herwaarden JA, de Vries JP, Laman JD, Huizinga R, Pasterkamp G, Moll FL. Osteoprotegerin is associated with aneurysm diameter and proteolysis in abdominal aortic aneurysm disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;**32**, 1497-5104.
- Koshiol J, Wang E, Zhao Y, Marincola F, Landi MT. Strengths and limitations of laboratory procedures for microRNA detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;**19**, 907-911.
- Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS. The human mast cell: an overview. *Methods Mol. Biol*. 2006;**315**, 13-34.
- Krohn C, Kullmann G, Kvernebo K, Rosén L, Kroese A. Ultrasonographic screening for abdominal aortic aneurysm. *Eur J Surg*. 1992;**158**, 527-530.
- Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*. 1993; **13**, 1501-1504.
- Kurihara N, Inoue Y, Iwai T, Umeda M, Huang Y, Ishikawa I. Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;**28**, 553-558.

L

- Lamblin N, Ratajczak P, Hot D, Dubois E, Chwastyniak M, Beseme O, Drobecq H, Lemoine Y, Koussa M, Amouyel P, Pinet F. Profile of macrophages in human abdominal aortic aneurysms: a transcriptomic, proteomic, and antibody protein array study. *J Proteome Res.* 2010;**9**, 3720-3729.
- LaRoy LL, Cormier PJ, Matalon TA, Patel SK, Turner DA, Silver B. Imaging of abdominal aortic aneurysms. *AJR Am J Roentgenol.* 1989; **152**, 785-792.
- Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, Barone GW, Bandyk D, Moneta GL, Makhoul RG. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern.Med.* 2000; **160**, 1425-1430.
- Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE; Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study. Abdominal aortic aneurysm in women. *J Vasc Surg.* 2001;**34**, 122-126.
- Lee A, Fowkes F, Carson M, Leng G, Allan P. Smoking, atherosclerosis and risk of abdominal aortic aneurysm. *Eur Heart J.* 1997;**18**, 671-676.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;**75**, 843-854.
- Li T, Cao H, Zhuang J, Wan J, Guan M, Yu B, Li X, Zhang W. Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clin Chim Acta.* 2011;**412**, 66-70.
- Liao S, Curci JA, Kelley BJ, Sicard GA, Thompson RW. Accelerated replicative senescence of medial smooth muscle cells derived from abdominal aortic aneurysms compared to the adjacent inferior mesenteric artery. *J Surg Res.* 2000;**92**, 85-95.
- Lindblad B, Börner G, Gottsäter A. Factors associated with development of large abdominal aortic aneurysm in middle-aged men. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;**30**, 346-352.
- Lindholt JS, Erlandsen EJ, Henneberg EW. Cystatin C deficiency is associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 2001;**88**, 1472-1475.
- Lindholt J, Jorgensen B, Shi G-P, Henneberg EW. Relationships between activators and inhibitors of plasminogen, and the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovas Surg.* 2003;**25**, 546–551.
- Lindholt JS, Heickendorff L, Henneberg EW, Fasting H. Serum elastin-peptides as a predictor of expansion of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997;**14**, 12e6.
- Lindholt JS, Jorgensen B, Klitgaard NA, Henneberg EW. Systemic levels of cotinine and elastase, but not pulmonary function, are associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;**26**, 418e22.

- Lindholt JS, Sorensen HT, Michel JB, Thomsen HF, Henneberg EW. Low-dose aspirin may prevent growth and later surgical repair of medium-sized abdominal aortic aneurysms. *Vasc Endovascular Surg*. 2008;**42**, 329-334.
- Lindholt JS, Sorensen J, Sogaard R, Henneberg EW. Long-term benefit and cost-effectiveness analysis of screening for abdominal aortic aneurysms from a randomized controlled trial. *Br.J Surg*. 2010; **97**, 826-834.
- Lindholt JS, Vammen S, Fasting H, Henneberg EW, Heickendorff L. The plasma level of matrix metalloproteinase 9 may predict the natural history of small abdominal aortic aneurysms. A preliminary study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000;**20**, 281-285.
- Linne A, Leander K, Lindström D, Törnberg S, Hultgren R. Reasons for non-participation in population-based abdominal aortic aneurysm screening. *Br J Surg*. 2014;**101**, 481-487.
- Liotta L, Petricoin E. Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2000;**1**, 48-56.
- Liu CG, Spizzo R, Calin GA, Croce CM. Expression profiling of microRNA using oligo DNA arrays. *Methods*. 2008;**44**, 22–30.
- Lohoefer F, Reeps C, Lipp C, Rudelius M, Zimmermann A, Ockert S, Eckstein HH, Pelisek J. Histological analysis of cellular localization of cathepsins in abdominal aortic aneurysm wall. *Int. J. Exp. Path*. 2012;**93**, 252-258.
- López-Candales A, Holmes DR, Liao S, Scott MJ, Wickline SA, Thompson RW. Decreased vascular smooth muscle cell density in medial degeneration of human abdominal aortic aneurysms. *Am J Pathol*. 1997;**150**, 993-1007.
- López-Romero P. Pre-processing and differential expression analysis of Agilent microRNA arrays using the AgiMicroRna Bioconductor library. *BMC Genomics*. 2011;**12**, 64.
- Lu DP, Read RL, Humphreys DT, Battah FM, Martin DI, Rasko JE. PCR-based expression analysis and identification of microRNAs. *J RNAi Gene Silencing*. 2005;**1**, 44-49.
- Lv BJ, Lindholt JS, Cheng X, Wang J, Shi GP. Plasma cathepsin S and cystatin C levels and risk of abdominal aortic aneurysm: a randomized population-based study. *PLoS One*. 2012;**7**, e41813.

M

- A- Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Deng A, Chin JT, Raaz U, Schoelmerich AM, Raiesdana A, Leeper NJ, McConnell MV, Dalman RL, Spin JM, Tsao PS. Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. *J Clin Invest*. 2012;**122**, 497-506.
- B- Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Deng A, Merk DR, Raiesdana A, Leeper NJ, Raaz U, Schoelmerich AM, McConnell MV, Dalman RL, Spin JM, Tsao PS. MicroRNA-21 blocks abdominal aortic aneurysm development and nicotine-augmented expansion. *Sci Transl Med*. 2012;**4**, 122ra22.
- Maegdefessel L, Azuma J, Tsao PS. MicroRNA-29b regulation of abdominal aortic aneurysm development. *Trends Cardiovasc Med*. 2014;**24**, 1-6.

- Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. 2004;**430**, 213-218.
- Martinez-Pinna R, Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Blanco-Colio LM, Lopez JA, Calvo E, Camafeita E, Lindholt JS, Meilhac O, Delbosc S, Michel JB, Vega de Ceniga M, Egido J, Martin-Ventura JL. Identification of peroxiredoxin-1 as a novel biomarker of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011;**31**, 935–943.
- Martinez-Pinna R, Lindholt JS, Madrigal-Matute J, Blanco-Colio LM, Esteban-Salan M, Torres-Fonseca MM, Lefebvre T, Delbosc S, Laustsen J, Driss F, Vega de Ceniga M, Gouya L, Weiss G, Egido J, Meilhac O, Michel JB, Martin-Ventura J. From tissue iron retention to low systemic haemoglobin levels, new pathophysiological biomarkers of human abdominal aortic aneurysm. *Thromb Haemost*. 2014;**112**, 87-95.
- Martín-Ventura JL, Lindholt JS, Moreno JA, Vega de Céniga M, Meilhac O, Michel JB, Egido J, Blanco-Colio LM. Soluble TWEAK plasma levels predict expansion of human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2011;**214**, 486-489.
- McCormick ML, Gavrilu D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;**27**, 461-469.
- McCulloch DR, Le Goff C, Bhatt S, Dixon LJ, Sandy JD, Apte SS. Adamts5, the gene encoding a proteoglycan-degrading metalloprotease, is expressed by specific cell lineages during mouse embryonic development and in adult tissues. *Gene Expr. Patterns*. 2009; **9**, 314-323.
- McMillan WD, Pearce WH. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1999;**29**, 122–127.
- Michel JB, Martin-Ventura JL, Egido J, Sakalihasan N, Treska V, Lindholt J, Allaire E, Thorsteinsdottir U, Cockerill G, Swedenborg J; FAD EU consortium. Novel aspects of the pathogenesis of aneurysms of the abdominal aorta in humans. *Cardiovasc Res*. 2011;**90**, 18-27.
- Michel JB, Thaunat O, Houard X, Meilhac O, Caligiuri G, Nicoletti A. Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;**27**, 1259-1268.
- Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;**23**, 2146-2154.
- Middleton RK, Lloyd GM, Bown MJ, Cooper NJ, London NJ, Sayers RD. The pro-inflammatory and chemotactic cytokine microenvironment of the abdominal aortic aneurysm wall: a protein array study. *J Vasc Surg*. 2007;**45**, 574-580.
- Midwinter RG, Maghazal GJ, Dennis JM, et al. Succinobucol induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Free Radical Biol Med*. 2012, **52**, 871-879.
- Model MA. Possible causes of apoptotic volume decrease: an attempt at quantitative review. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 ;**306**, C417-424.

- Molacek J, Treska V, Kobr J, Certik B, Skalicky T, Kuntscher V, Krizkova V. Optimization of the model of abdominal aortic aneurysm--experiment in an animal model. *J Vasc Res*. 2009; **46**, 1-5.
- Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation*. 2011;**124**, 1537-1547.
- Moos M.P., John N., Gräbner R., Nossmann S., Günther B., Vollandt R., Funk C.D., Kaiser B., Habenicht A.J. The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoproteinE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; **25**, 2386–2391.
- Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2012;**40**, 6391-6400.
- Moris D, Mantonakis E, Avgerinos E, Makris M, Bakoyiannis C, Pikoulis E, Georgopoulos S. Novel biomarkers of abdominal aortic aneurysm disease: identifying gaps and dispelling misperceptions. *Biomed Res Int*. 2014;**2014**, 925840.
- Mosorin M, Juvonen J, Biancari F, Satta J, Surcel HM, Leinonen M, Saikku P, Juvonen T. Use of doxycycline to decrease the growth rate of abdominal aortic aneurysms: a randomized, double-blind, placebocontrolled pilot study. *J Vasc Surg*. 2001;**34**, 606–610.
- Moxon JV, Parr A, Emeto TI, Walker P, Norman PE, Golledge J. Diagnosis and monitoring of abdominal aortic aneurysm: current status and future prospects. *Curr Probl Cardiol*. 2010;**35**, 512-548.
- Murray GI. An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem*. 2007;**109**, 171-176.

N

- Nakamura M, Tachieda R, Niinuma H, Ohira A, Endoh S, Hiramori K, Makita S. Circulating biochemical marker levels of collagen metabolism are abnormal in patients with abdominal aortic aneurysm. *Angiology*. 2000;**51**, 385-392.
- Newman KM, Ogata Y, Malon AM, Irizarry E, Gandhi RH, Nagase H, Tilson MD. Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb*. 1994;**14**, 1315-1320.
- Neyt K.,Perros F.,Geurtsvankessel C.H., Hammad H., Lambrecht B.N. (2012).Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. *Trends Immunol*. 2012;**33**, 297-305.
- Nielsen M, Hansen JH, Hedegaard J, Nielsen RO, Panitz F, Bendixen C, Thomsen B. MicroRNA identity and abundance in porcine skeletal muscles determined by deep sequencing. *Anim Genet*. 2010;**41**, 159-168.
- Norman PE, Davis TM, Le MT, Golledge J. Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association. *Connect.Tissue Res*. 2007; **48**, 125-131.

Nuovo GJ. In situ detection of microRNAs in paraffin embedded, formalin fixed tissues and the co localization of their putative targets. *Methods*. 2010;**52**, 307-315.

O

Ocana E, Bohorquez JC, Perez-Requena J, Brieva JA, Rodriguez C. Characterisation of T and B lymphocytes infiltrating abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2003;**170**, 39-48.

Oderich GS, Panneton JM, Bower TC, Cherry KJ, Rowland CM, Noel AA, et al. Infected aortic aneurysms: aggressive presentation, complicated early outcome, but durable results. *J Vasc Surg*. 2001;**34**, 900-908.

P

Pagano MB, Bartoli MA, Ennis TL, Mao D, Simmons PM, Thompson RW, Pham CT. Critical role of dipeptidyl peptidase I in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*. 2007;**104**, 2855-2860.

Pan JH, Lindholt JS, Sukhova GK, Baugh JA, Henneberg EW, Bucala R, Donnelly SC, Libby P, Metz C, Shi GP. Macrophage migration inhibitory factor is associated with aneurysmal expansion. *J Vasc Surg*. 2003;**37**, 628-635.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;**408**, 86-89.

Patel MI, Melrose J, Ghosh P, Appleberg M. Increased synthesis of matrix metalloproteinases by aortic smooth muscle cells is implicated in the etiopathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1996;**24**, 82-92.

Patrick DM, Zhang CC, Tao Y, Yao H, Qi X, Schwartz RJ, Jun-Shen Huang L, Olson EN. Defective erythroid differentiation in miR-451 mutant mice mediated by 14-3-3zeta. *Genes Dev*. 2010;**24**, 1614-1619.

Petersen MJ, Cambria RP, Kaufman JA, LaMuraglia GM, Gertler JP, Brewster DC, Geller SC, Waltman AC, L'Italien GJ, Abbott WM. Magnetic resonance angiography in the preoperative evaluation of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1995;**21**, 891-898.

Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB. Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet*. 2014;**5**, 23.

Piedrahita JA, Zhang SH, Hagaman JR, Oliver PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*. 1992; **89**, 4471-4475.

Pinet F, Lamblin N, Ratajczak P, Hot D, Dubois E, Chwastyniak M, Beseme O, Drobecq H, Lemoine Y, Koussa M, Amouyel P. Transcriptomic and proteomic profiles of vascular cells involved in human abdominal aortic aneurysm, Etiology, Pathogenesis and Pathophysiology of Aortic Aneurysms and Aneurysm Rupture, Prof. Reinhart Grundmann (Ed.). 2011. ISBN: 978-953-307-

523-5, InTech, DOI: 10.5772/20588. Available from: <http://www.intechopen.com/books/etiology-pathogenesis-and-pathophysiology-of-aortic-aneurysms-and-aneurysm-rupture/transcriptomic-and-proteomic-profiles-of-vascular-cells-involved-in-human-abdominal-aortic-aneurysm>.

Powell J, Greenhalgh RM. Cellular, enzymatic, and genetic factors in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1989;**9**, 297-304.

Prall AK, Longo GM, Mayhan WG, Waltke EA, Fleckten B, Thompson RW, Baxter BT. Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice. *J Vasc Surg*. 2002;**35**, 923-929.

Q

Qian HS, Gu JM, Liu P, Kauser K, Halks-Miller M, Vergona R, Sullivan ME, Dole WP, Deng GG. Overexpression of PAI-1 prevents the development of abdominal aortic aneurysm in mice. *Gene Ther*. 2008; **15**, 224-232.

Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med*. 2006;**354**, 2463-2472.

R

Ramazani M, Lundin C, Sund M. Increased circulating levels of basement-membrane components in patients with abdominal aortic aneurysms-a pilot study. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;**42**, 484-487.

Ramos-Mozo P, Rodriguez C, Pastor-Vargas C, Blanco-Colio LM, Martinez-Gonzalez J, Meilhac O, Michel JB, Vega de Ceniga M, Egido J, Martin-Ventura JL. Plasma profiling by a protein array approach identifies IGFBP-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm. *Atherosclerosis*. 2012;**221**, 544-550.

Rateri DL, Howatt DA, Moorleggen JJ, Charnigo R, Cassis LA, Daugherty A. Prolonged infusion of angiotensin II in apoE(-/-) mice promotes macrophage recruitment with continued expansion of abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol*. 2011;**179**, 1542-1548.

A- Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, van Gils JM, Rayner AJ, Chang AN, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Fisher EA, Moore KJ. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2011;**121**, 2921-2931.

B- Rayner KJ, Esau CC, Hussain FN, McDaniel AL, Marshall SM, van Gils JM, Ray TD, Sheedy FJ, Goedeke L, Liu X, Khatsenko OG, Kaimal V, Lees CJ, Fernandez-Hernando C, Fisher EA, Temel RE, Moore KJ. Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*. 2011;**478**, 404-407.

Reeps C, Pelisek J, Seidl S, Schuster T, Zimmermann A, Kuehnl A, Eckstein HH. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology*. 2009;**76**, 243-252.

Rizzo RJ, McCarthy WJ, Dixit SN, Lilly MP, Shively VP, Flinn WR, Yao JS. Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1989;**10**, 365-373.

Roggério A, Sambiase NV, Palomino SA, de Castro MA, da Silva ES, Stolf NG, de Lourdes Higuchi M. Correlation of bacterial coinfection versus matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in aortic aneurysm and atherosclerosis. *Ann Vasc Surg*. 2013;**27**, 964-971.

Rush C, Nyara M, Moxon JV, Trollope A, Cullen B, Golledge J. Whole genome expression analysis within the angiotensin II-apolipoprotein E deficient mouse model of abdominal aortic aneurysm. *BMC Genomics*. 2009; **10**, 298.

S

Sakthivel P, Shively V, Kakoulidou M, Pearce W, Lefvert AK. The soluble forms of CD28, CD86 and CTLA-4 constitute possible immunological markers in patients with abdominal aortic aneurysm. *J Intern Med*. 2007;**261**, 399-407.

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000;**45**, 528-37.

Satta J, Juvonen T, Haukipuro K, Juvonen M, Kairaluoma MI. Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples. *J Vasc Surg*. 1995;**22**, 155-160.

Satta J, Immonen K, Reinilä A, Pokela R, Juvonen T. Outcome of elective infrarenal abdominal aortic aneurysm repair--an analysis of 174 consecutive patients. *Ann Chir Gynaecol*. 1996;**85**, 231-235.

Satta J, Haukipuro K, Kairaluoma MI, Juvonen T. Aminoterminal propeptide of type III procollagen in the follow-up of patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1997;**25**, 909-915.

Scott A, Ashton A, Kay N. Abdominal aortic aneurysm in 4237 screened patients: prevalence, development and management over 6 years. *Br J Surg*. 1991;**78**, 1122-1125.

Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 2010; **339**, 237-246.

Shibamura H, Olson JM, van Vlijmen-Van Keulen C, Buxbaum SG, Dudek DM, Tromp G, Ogata T, Skunca M, Sakalihan N, Pals G, Limet R, MacKean GL, Defawe O, Verloes A, Arthur C, Lossing AG, Burnett M, Sueda T, Kuivaniemi H. Genome scan for familial abdominal aortic aneurysm using sex and family history as covariates suggests genetic heterogeneity and identifies linkage to chromosome 19q13. *Circulation*. 2004;**109**, 2103-2108.

Shiraya S, Miwa K, Aoki M, Miyake T, Oishi M, Kataoka K, Ohgi S, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R. Hypertension accelerated experimental abdominal aortic aneurysm through upregulation of nuclear factor kappaB and Ets. *Hypertension*. 2006;**48**, 628-636.

Sho E, Sho M, Nanjo H, Kawamura K, Masuda H, Dalman RL. Comparison of cell-type-specific vs transmural aortic gene expression in experimental aneurysms. *J Vasc Surg*. 2005 ;**41**, 844-852.

- Shteinberg D, Halak M, Shapiro S, Kinarty A, Sobol E, Lahat N, Karmeli R. Abdominal aortic aneurysm and aortic occlusive disease: a comparison of risk factors and inflammatory response. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000;**20**, 462-465.
- Silane MF, Conte KM, Fantini GA, Kazam E. Aortic aneurysmal disease in women: is there a greater incidence of suprarenal involvement? *Ann N Y Acad Sci*. 1996;**800**, 256–257.
- Silverberg D, Younis A, Savion N, Harari G, Yakubovitch D, Sheick Yousif B, Halak M, Grossman E, Schneiderman J. Long-term renin-angiotensin blocking therapy in hypertensive patients with normal aorta may attenuate the formation of abdominal aortic aneurysms. *J Am Soc Hypertens*. 2014 . pii: S1933-1711(14)00512-9.
- Simoni G, Pastorino C, Perrone R, Ardia A, Gianrossi R, Decian F, et al. Screening for abdominal aortic aneurysms and associated risk factors in a general population. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1995;**10**, 207-210.
- Singh K, Bønaa K, Jacobsen B, Bjørk L, Solberg S. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study. The Tromsø study. *Am J Epidemiol* 2001;**154**, 236-244.
- Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*. 2010;**121**, 1022-1032.
- Smith C, Grimshaw M, Paterson S, Shearman P, Hamer D. Ultrasonographic screening for abdominal aortic aneurysm in an urban community. *Br J Surg*. 1993;**80**, 1406-1409.
- Sofi F, Marcucci R, Giusti B, Pratesi G, Lari B, Sestini I, Lo Sapio P, Pulli R, Pratesi C, Abbate R, Gensini GF. High levels of homocysteine, lipoprotein (a) and plasminogen activator inhibitor-1 are present in patients with abdominal aortic aneurysm. *Thromb Haemost*. 2005;**94**, 1094-1098.
- Spark JJ, Laws P, Fitridge R. The incidence of hyperhomocysteinaemia in vascular patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003; **26**, 558–561.
- Speer MY, Chien YC, Quan M, Yang HY, Vali H, McKee MD, Giachelli CM. Smooth muscle cells deficient in osteopontin have enhanced susceptibility to calcification in vitro. *Cardiovasc Res*. 2005;**66**, 324-333.
- Stackelberg O, Björck M, Sadr-Azodi O, Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Obesity and abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg*. 2013;**100**, 360-366.
- Stather PW, Sidloff DA, Rhema IA, Choke E, Bown MJ, Sayers RD. A review of current reporting of abdominal aortic aneurysm mortality and prevalence in the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014;**47**, 240-242.
- Stenbaek J, Kalin B, Swedenborg J. Growth of thrombus is a better predictor for rupture than diameter in patients with abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2000;**20**, 466–469.
- Sun CY, She XM, Qin Y, Chu ZB, Chen L, Ai LS, Zhang L, Hu Y. miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis*. 2013;**34**, 426-435.

Sun J, Sukhova GK, Yang M, Wolters PJ, MacFarlane LA, Libby P, Sun C, Zhang Y, Liu J, Ennis TL, Knispel R, Xiong W, Thompson RW, Baxter BT, Shi GP. Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *J Clin Invest*. 2007;**117**, 3359-3368.

Svensjö S, Björck M, Gürtelschmid M, Djavan G, Gidlund K, Hellberg A, Wanhainen A. Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old Swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease. *Circulation*. 2011;**124**, 1118-1123.

Svensjö S, Mani K, Björck M, Lundkvist J, Wanhainen A. Screening for abdominal aortic aneurysm in 65-year-old men remains cost-effective with contemporary epidemiology and management. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014;**47**, 357-365.

Swedenborg J, Mayranpaa MI, Kovanen PT. Mast cells: important players in the orchestrated pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;**31**, 734-740.

Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT. RESCAN collaborators. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg*. 2012;**99**, 655–665.

T

Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS. Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol*. 2010;**220**, 126-139.

Takagi H, Umemoto T. A contemporary meta-analysis of the association of diabetes with abdominal aortic aneurysm. *Int Angiol*. 2014. *In Press*.

Takagi H, Manabe H, Kawai N, Goto SN, Umemoto T. Circulating lipoprotein(a) concentrations and abdominal aortic aneurysm presence. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2009;**9**, 467-470.

Takagi H, Manabe H, Kawai N, Goto S-N, Umemoto T. Serum high-density and low-density lipoprotein cholesterol is associated with Abdominal Aortic Aneurysm presence: a systematic review and meta-analysis. *International Angiology*. 2010;**29**, 371–375.

Tamarina NA, McMillan WD, Shively VP, Pearce WH. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in aneurysms and normal aorta. *Surgery*. 1997;**122**, 264-272.

Tazume H, Miyata K, Tian Z, Endo M, Horiguchi H, Takahashi O, Horio E, Tsukano H, Kadomatsu T, Nakashima Y, Kunitomo R, Kaneko Y, Moriyama S, Sakaguchi H, Okamoto K, Hara M, Yoshinaga T, Yoshimura K, Aoki H, Araki K, Hao H, Kawasuji M, Oike Y. Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; **32**, 1400-1409.

Tchetina EV, Squires G, Poole AR. Increased type II collagen degradation and very early focal cartilage degeneration is associated with upregulation of chondrocyte differentiation related genes in early human articular cartilage lesions. *J Rheumatol*. 2005;**32**, 876-886.

The United Kingdom Small Aneurysm Trial Participants. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. *Ann Surg*. 1999;**230**, 289–296.

Thompson AR, Golledge J, Cooper JA, Hafez H, Norman PE, Humphries SE. Sequence variant on 9p21 is associated with the presence of abdominal aortic aneurysm disease but does not have an impact on aneurysmal expansion. *Eur J Hum Genet.* 2009;**17**, 391-394.

Thompson RW, Geraghty PJ, Lee JK. Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications. *Curr Probl.Surg.* 2002; **39**, 110-230.

Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, Welgus HG, Parks WC. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *J Clin Invest.* 1995;**96**, 318-326.

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 2008;**456**, 980-984.

Törnwall M, Virtamo J, Haukka J, Albanes D, Huttunen J. Life-style factors and risk for abdominal aortic aneurysm in a cohort of Finnish male smokers. *Epidemiology.* 2001;**12**, 94-100.

Touat Z, Ollivier V, Dai J, Huisse MG, Bezeaud A, Sebbag U, Palombi T, Rossignol P, Meilhac O, Guillin MC, Michel JB. Renewal of mural thrombus releases plasma markers and is involved in aortic abdominal aneurysm evolution. *Am J Pathol.* 2006;**168**, 1022-1030.

Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim MH, Stoffel M. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature.* 2011;**474**, 649-653.

Trollope A, Moxon JV, Moran CS, Golledge J. Animal models of abdominal aortic aneurysm and their role in furthering management of human disease. *Cardiovasc Pathol.* 2011; **20**, 114-123.

Tromp G, Ogata T, Gregoire L, Goddard KA, Skunca M, Lancaster WD, Parrado AR, Lu Q, Shibamura H, Sakalihasan N, Limet R, Mackean GL, Arthur C, Sueda T, Kuivaniemi H. HLA-DQA is associated with abdominal aortic aneurysms in the Belgian population. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;**1085**, 392-395.

Tromp G, Kuivaniemi H. Developments in genomics to improve understanding, diagnosis and management of aneurysms and peripheral artery disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2009;**38**, 676-682.

U

Urbonavicius S, Urbonaviciene G, Honoré B, Henneberg EW, Vorum H, Lindholt JS. Potential circulating biomarkers for abdominal aortic aneurysm expansion and rupture--a systematic review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008;**36**, 273-82.

V

Van der Ree MH, van der Meer AJ, de Bruijne J, Maan R, van Vliet A, Welzel TM, Zeuzem S, Lawitz EJ, Rodriguez-Torres M, Kupcova V, Wiercinska-Drapalo A, Hodges MR, Janssen HL, Reesink

HW. Long-term safety and efficacy of microRNA-targeted therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res.* 2014. pii: S0166-3542(14)00252-6.

Van Laake LW, Vainas T, Dammers R, Kitslaar PJ, Hoeks AP, Schurink GW. Systemic dilation diathesis in patients with abdominal aortic aneurysms: a role for matrix metalloproteinase-9? *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;**29**, 371-377.

Van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res.* 2011;**108**, 219-234.

Van Rooij E, Purcell AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics. *Circ Res.* 2012;**110**, 496-507.

Van Spyk EN, Chun KC, Samadzadeh KM, Peters JH, Lee ES. Increased levels of CD34+ cells are associated in patients with abdominal aortic aneurysms compared with patients with peripheral vascular disease. *J Surg Res.* 2013;**184**, 638-643.

Van Vlijmen-van Keulen CJ, Rauwerda JA, Pals G. Genome-wide linkage in three Dutch families maps a locus for abdominal aortic aneurysms to chromosome 19q13.3. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005; **30**, 29-35.

Vardulaki K, Walker N, Day N, Duffy S, Ashton H, Scott A. Quantifying the risk of hypertension, age, sex and smoking in patients with abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 2000;**87**, 195-200.

Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. *Circulation.* 2006;**113**, 2335-2362.

Vorp DA, Lee PC, Wang DH, Makaroun MS, Nemoto EM, Ogawa S, Webster MW. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *J Vasc Surg.* 2001;**34**, 291-299.

W

Wahlgren CM, Larsson E, Magnusson PK, et al. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *J Vasc Surg.* 2010;**51**, 3–7.

Wallinder J, Bergström J, Henriksson AE. Discovery of a novel circulating biomarker in patients with abdominal aortic aneurysm: a pilot study using a proteomic approach. *Clin Transl Sci.* 2012;**5**, 56-59.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;**10**, 57-63.

Wanhainen A, Bergqvist D, Boman K, Nilsson TK, Rutegård J, Björck M. Risk factors associated with abdominal aortic aneurysm: a population-based study with historical and current data. *J Vasc Surg.* 2005;**41**, 390-396.

Wanhainen A, Nilsson TK, Bergqvist D, Boman K, Björck M. Elevated tissue plasminogen activator in patients with screening-detected abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2007;**45**, 1109-1113.

Wang K., Liu F., Zhou L.Y., Long B., Yuan S.M., Wang Y., Liu C.Y., Sun T., Zhang X.J., Li P.F. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. *Circ Res.* 2014; **114**, 1377-1388.

Wemmelund 2014- Wemmelund H1, Høgh A, Hundborg HH, Thomsen RW, Johnsen SP, Lindholt JS. Statin use and rupture of abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 2014;**101**, 966-975.

Wilson JS, Virag L, Di Achille P, Karsaj I, Humphrey JD. Biochemomechanics of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysms. *J Biomech Eng.* 2013;**135**, 021011.

Wilson WR, Herbert KE, Mistry Y, Stevens SE, Patel HR, Hastings RA, Thompson MM, Williams B. Blood leucocyte telomere DNA content predicts vascular telomere DNA content in humans with and without vascular disease. *Eur Heart J.* 2008;**29**, 2689-2694.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009;**11**, 228-234.

Wolf YG, Thomas WS, Brennan FJ, Goff WG, Sise MJ, Bernstein EF. Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1994;**20**, 529-535.

Wong YY, Flicker L, Yeap BB, McCaul KA, Hankey GJ, Norman PE. IS hypovitaminosis D associated with Abdominal Aortic Aneurysm, and is there a dose-response relationship? *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery.* 2013;**45**, 657-664.

Worm J, Stenvang J, Petri A, Frederiksen KS, Obad S, Elmén J, Hedtjærn M, Straarup EM, Hansen JB, Kauppinen S. Silencing of microRNA-155 in mice during acute inflammatory response leads to derepression of c/ebp Beta and down-regulation of G-CSF. *Nucleic Acids Res.* 2009;**37**, 5784-5792.

X

Xiong J, Wang SM, Chen LH, Lin Y, Zhu YF, Ye CS. Elastic fibers reconstructed using adenovirus-mediated expression of tropoelastin and tested in the elastase model of abdominal aortic aneurysm in rats. *J Vasc Surg.* 2008 ;**48**, 965-973.

Y

Yeap BB, Chubb SA, McCaul KA, Flicker L, Ho KK, Golledge J, Hankey GJ, Norman PE. Associations of IGF1 and its binding proteins with abdominal aortic aneurysm and aortic diameter in older men. *Eur J Endocrinol.* 2012;**166**, 191-197.

Yin JQ, Zhao RC, Morris KV. Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends Biotechnol.* 2008;**26**, 70-76.

Yin M, Zhang J, Wang Y, Wang S, Böckler D, Duan Z, Xin S. Deficient CD4+CD25+ T regulatory cell function in patients with abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;**30**, 1825-1831.

Yoshida S, Fuster JJ, Walsh K. Adiponectin attenuates abdominal aortic aneurysm formation in hyperlipidemic mice. *Atherosclerosis*. 2014;**235**, 339-346.

Z

Zhang J, Sun J, Lindholt JS, Sukhova GK, Sinnamon M, Stevens RL, Adachi R, Libby P, Thompson RW, Shi GP. Mast cell tryptase deficiency attenuates mouse abdominal aortic aneurysm formation. *Circ Res*. 2011;**108**, 1316-1327.

Zhou M, Veenstra TD. Proteomic analysis of protein complexes. *Proteomics*. 2007;**7**, 2688-2697.

Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem*. 2007;**40**, 101-111.

Zweers MC, Peeters AC, Graafsma S, Kranendonk S, van der Vliet JA, den Heijer M, Schalkwijk J. Abdominal aortic aneurysm is associated with high serum levels of tenascin-X and decreased aneurysmal tissue tenascin-X. *Circulation*. 2006;**113**, 1702–1707.